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

Estudos de síntese de fármacos dirigidos formadores de micelas de
hidroximetilnitrofural e helenalina potencialmente antichagásicos e
leishmanicidas

Vanessa Almeida Otelo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

Co-orientadora:
Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

SÃO PAULO
2012

Vanessa Almeida Otelo

Estudos de síntese de fármacos dirigidos formadores de micelas de
hidroximetilnitrofural e helenalina potencialmente antichagásicos e
leishmanicidas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
Orientadora e Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICO ESTE TRABALHO.

Aos meus pais:

*A minha mãe, **Beatriz de Oliveira Almeida Otelo**, por todo amor, amizade, dedicação e por tudo que representa em minha vida (difícil traduzir em palavras)! Sem o seu incentivo e apoio incondicional eu não conseguiria!*

*Ao meu saudoso pai, **Raimundo Nonato Souza Otelo** (in memorian), por todo amor e incentivo. O Srº sempre se fez tão presente em todos os momentos, deixou-me um exemplo de vida, de sabedoria e de bons exemplos que estarão sempre vivos em meu coração!*

*Aos meus sobrinhos **Enzo Rafael Moraes Otelo**, **Liz Helena Moraes Otelo**, ao meu irmão **Alexandre Almeida Otelo**, minha cunhada **Renata Celina Moraes Otelo** e minha mãe do coração **Marinalva Pereira Dias** por fazerem parte da minha vida, por entenderem minha ausência e por se fazerem presentes com palavras de incentivo, por todo carinho e torcida!*

A Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira, a quem sou inteiramente grata pela boa acolhida no doutorado e pela orientação que ultrapassou a tese, com seu exemplo profissional! Muito obrigada pela oportunidade de realização deste sonho, tão importante para mim, por todos os ensinamentos, paciência e pelo privilégio de ser sua aluna e trabalhar com um tema tão relevante e necessário!

A Profa. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, que me ensinou muito com seu exemplo profissional! Muito obrigada por ser minha co-orientadora, por toda dedicação, disponibilidade em ajudar e por todos os valiosos ensinamentos e sugestões sempre!

*A VOCÊS TODO MEU RESPEITO, ADMIRAÇÃO E
CARINHO!*

AGRADECIMENTOS

Primeiro a Deus, pela força, pelo amparo e por sempre me fazer acreditar na vida e na concretização dos sonhos.

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao pesquisador Dr. Marcio Henrique Zaim, pela grande ajuda e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho que muito contribuíram para minha formação.

A Profa. Dra. Daniela Gonçalves Rando, pelas contribuições no texto de qualificação e por toda amizade e carinho, conversas e incentivo sempre!!!

Ao Dr. Marco Arribas, por todo auxílio no laboratório.

Ao Dr. Fabricio Vargas, pelas discussões dos resultados de RMN e pela disponibilidade em ajudar sempre.

A Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, pela amizade, ajuda, ensinamentos e disponibilidade no trabalho de modelagem molecular.

Ao Prof. Flavio Emery por gentilmente nos fornecer o ácido anacárdico.

A Profa. Ivone Carvalho, por todas as valiosas contribuições para este trabalho, no exame de qualificação.

Ao Prof. Omar A. El Seoud, pelo ensaio de espalhamento de luz dinâmico e por todas as sugestões no exame de qualificação.

Ao Prof. Pedro de Alcântara Pessoa Filho, da Engenharia Química da USP, por toda ajuda e ensinamentos no experimento de osmolaridade com o polímero dextrano.

Ao técnico Paulo Augusto Rodrigues Pires, pelo auxílio nos ensaios de espalhamento de luz dinâmico.

Ao técnico Charles de Lima Brito, por todo auxílio e assistência no laboratório.

À Maria Inês de Almeida Gonçalves, pelo auxílio nas análises de RMN.

À Jeanine Giarolla, pela amizade do dia a dia que tornou as dificuldades mais amenas com suas palavras de incentivo, conversas diárias, apoio e prontidão em ajudar, muito obrigada!

A Soraya da Silva Santos e Andressa Polidoro, pela amizade, conversas e por todo apoio!

Aos Professores Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini e Dr. Roberto Parise Filho e aos amigos de laboratório Bárbara Vaz, Fredson Torres, Hamilton Bigatão, João Paulo Lemes (in memorian), Kátia Botelho, Kely Turra, Marina Primi, Natanael Segretti e Ricardo Serafim, pelo agradável convívio diariamente.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Bete, David, Jorge, Elaine e Daniela, pelo auxílio nos problemas burocráticos.

E, finalmente, a toda minha família e amigos, que entenderam meus momentos de ausência e que me apoiaram e incentivaram no decorrer desses anos e que muito contribuíram para a concretização deste sonho, MEUS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

Charles Chaplin

Otelo, V.A. Estudos de **síntese de fármacos dirigidos formadores de micelas do hidroximetilnitrofural e helenalina potencialmente antichagásicos e leishmanicidas**. 2012.

161p. Tese – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

RESUMO

A doença de Chagas e as leishmanioses são doenças endêmicas tropicais, que afetam milhões de pessoas, especialmente em países subdesenvolvidos, e são responsáveis por série de implicações médicas, sociais e econômicas. Seus agentes etiológicos são protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, os quais provocam várias manifestações clínicas, dependendo do tipo de protozoário infectante, da imunidade do hospedeiro e da progressão destas infecções. Atualmente, os principais problemas relacionados a estas parasitoses são a carência de fármacos eficazes, a elevada toxicidade dos fármacos disponíveis na terapêutica, bem como o crescente número de casos de resistência. Neste contexto, a busca por novos e melhores quimioterápicos contra essas doenças é urgente. A latenciação é um dos processos que podem ser utilizados com vistas a esse objetivo. Por meio desse processo, o uso de micelas poliméricas como transportadoras de fármacos com a finalidade de prolongar a ação e, conseqüentemente, diminuir a toxicidade do fármaco, tem sido crescente. Ademais, é possível dirigir a ação dessas formas de transporte por meio de fármacos dirigidos. Face ao exposto, o presente trabalho teve por objetivo a síntese fármacos dirigidos formadores de micelas dos compostos bioativos helenalina e hidroximetilnitrofural, os quais apresentam atividade tripanomicida e leishmanicida. Pretende-se, assim, promover a liberação controlada e a conseqüente diminuição da toxicidade destes compostos, bem como melhorar suas características físico-químicas. A ação destes compostos será dirigida para macrófagos, no interior dos quais se encontram os parasitos, através da ligação do tiomanosídio como grupo diretor das micelas.

Otelo, V.A. **Synthesis studies of micelle-forming targeted drugs of hidroxitetilnitrofural and helenalin potentially antichagasic and leishmanicide.** 2012.

161p. Thesis - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, 2012.

ABSTRACT

Chagas disease and leishmaniasis are endemic tropical diseases affecting millions of people, especially in underdeveloped countries, being responsible and they are responsible for relevant medical, social and economic matters. Etiological agents for both diseases are protozoa belonging to the Kinetoplastidae order, which cause various clinical manifestations depending on the type of protozoa infecting, the host immunity and the progression of the infection. Currently, the main problems with these parasitic diseases are the lack of effective drugs, the high toxicity of available drugs for their treatment and the growing number of cases of resistance. In this context, the search for new and better chemotherapeutic agents against those diseases is urgent. Latentiation is one of the molecular modification processes that can be used with the aim of achieving this objective. Through this process, the use of micelles as drug carriers with the objective of prolonging its action and, consequently, diminishing its toxicity has been increasing. Besides, it is possible to direct the action of those carriers through the targeted drugs. This said, in this work we studied the synthesis of micelle-forming targeted drugs of the bioactive compounds helenaline and hydroxymethylnitrofurazone, which showed to be trypanomicide and leishmanicide. Thus, promoting the controlled release and the consequent decreasing of the toxicity of those compounds, besides improving their physico-chemical properties are our goal. The action of those compounds will be directed to macrophages, where the parasites, mainly leishmanias, live, by covalent binding of the directed group thiomannoside to the micelles.

SUMÁRIO

1 Introdução	14
1.1 Doença de Chagas	15
1.1.1 Doença e epidemiologia	15
1.1.2 Ciclo evolutivo do parasito	17
1.1.3 Quimioterapia	18
1.2 Leishmanioses	20
1.2.1 Doença e epidemiologia	20
1.2.2 Ciclo evolutivo do parasito	23
1.2.3 Quimioterapia	26
1.2.4 Profilaxia	30
1.3 Produtos naturais como antiparasitários	31
1.4 Receptor de manose	34
1.5 Planejamento de novos fármacos	37
1.5.1 Latenciação	37
1.5.2 Micelas	39
1.5.2.1 Pró-fármacos micelares	42
1.6 Modelagem Molecular	44
2 Objetivo e Justificativa	46
3 Material e Métodos	49
3.1 Material	50
3.1.1 Reagentes e solventes	50
3.1.2 Equipamentos	51
3.1.3 Softwares para estudo de modelagem molecular	51
3.2 Métodos	51
3.2.1 Síntese	51
3.2.1.1 Síntese do hidroximetilnitrofural (NFOH)	51
3.2.1.2 Síntese do tiomanosídio	52

3.2.1.2.1 Pentacetato de manose	53
3.2.1.2.2 Pentabenzoato de manose	54
3.2.1.2.3 Brometo de 2,3,4,6- tetra- <i>O</i> -acetil- α - <i>D</i> -manopiranosila	55
3.2.1.2.4 Brometo de 2,3,4,6- tetra- <i>O</i> -benzoil- α - <i>D</i> -manopiranosila	56
3.2.1.2.5 Bromidrato de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α - <i>D</i> -manopiranosil-1-pseudotiouréia	57
3.2.1.2.6 Bromidrato de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoil- α - <i>D</i> -manopiranosil-1-pseudotiouréia	58
3.2.1.2.7 Tetra- <i>O</i> -acetil-1-tio- α - <i>D</i> -manopiranosídio de cianometila	59
3.2.1.2.8 Tetra- <i>O</i> -benzoil-1-tio- α - <i>D</i> -manopiranosídio de cianometila	60
3.2.1.2.9 1-Tio- α - <i>D</i> -manopiranosídio de 2-imino-2-metoxietila	61
3.2.1.3 Síntese do intermediário carboximetildextrano	64
3.2.1.4 Síntese do intermediário carboximetildextrano-etilenodiamina	65
3.2.1.5 Síntese do intermediário carboximetildextrano-manose	66
3.2.1.6 Síntese do intermediário carboximetildextrano-manose-mexicanina	67
3.2.1.7 Síntese do intermediário carboximetildextrano-manose-polipropilenoglicol	68
3.2.1.8 Hidrogenação do ácido anacárdico	69
3.2.1.9 Síntese do intermediário heptanoato do ácido anarcárdico reduzido	69
3.2.1.10 Síntese do intermediário etanoato do ácido anarcárdico reduzido	70
3.2.1.11 Síntese do intermediário éster etílico do ácido anacárdico-ácido monocloroacético	70
3.2.2 Métodos de purificação	71
3.2.2.1 Cromatografia em coluna	71
3.2.2.2 Cromatografia preparativa	72
3.2.3 Método analítico	72
3.2.3.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C	72
3.2.3.2 Cromatografia em camada delgada	72

3.2.4 Análise quantitativa das carboxilas livres do carboximetildextrano	72
3.2.5 Modelagem molecular	73
4 Resultados e Discussão	75
4.1 Síntese	76
4.1.1 Síntese do hidroximetilnitrofural (NFOH)	76
4.1.2 Síntese do tiomanosídio	78
4.1.2.1 Pentacetato de manose	82
4.1.2.2 Pentabenzoato de manose	85
4.1.2.3 Brometo de 2,3,4,6- tetra- <i>O</i> -acetil- α - <i>D</i> -manopiranosila	87
4.1.2.4 Brometo de 2,3,4,6- tetra- <i>O</i> -benzoil- α - <i>D</i> -manopiranosila	94
4.1.2.5 Bromidrato de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α - <i>D</i> -manopiranosil-1-pseudotiouréia	96
4.1.2.6 Bromidrato de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoil- α - <i>D</i> -manopiranosil-1-pseudotiouréia	101
4.1.2.7 Tetra- <i>O</i> -acetil-1-tio- α - <i>D</i> -manopiranosídio de cianometila	104
4.1.2.8 Tetra- <i>O</i> -benzoil-1-tio- α - <i>D</i> -manopiranosídio de cianometila	106
4.1.2.9 Tio- α - <i>D</i> -manopiranosídio de 2-imino-2-metoxietila	109
4.1.3. Síntese do intermediário carboximetildextrano	113
4.1.4 Síntese do intermediário carboximetildextrano-etilenodiamina	118
4.1.5 Síntese do intermediário carboximetildextrano-manose	121
4.1.6 Síntese do intermediário carboximetildextrano-manose-mexicanina	124
4.1.7 Síntese do intermediário carboximetildextrano-manose-polipropilenoglicol	126
4.1.8 Hidrogenação do ácido anacárdico	128
4.1.9 Síntese do intermediário heptanoato do ácido anarcárdico reduzido	130
4.1.10 Síntese do intermediário etanoato do ácido anarcárdico reduzido	132
4.1.11 Síntese do intermediário éster etílico do ácido anacárdico-ácido monocloroacético	134
4.2 Análise quantitativa das carboxilas livres do carboximetildextrano	135

4.3 Modelagem Molecular	138
5 Conclusões	140
6 Perspectivas	142
7 Referências Bibliográficas	144
Apêndice I	I
Apêndice II	X
Apêndice III	XVII
Anexos	XXVIII

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

1.1.1 Doença e epidemiologia

A doença de Chagas, descoberta pelo médico brasileiro Carlos Chagas, em 1909 (Bestetti *et al.*, 2009), é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* (WHO, 2008a). É uma doença endêmica, considerada extremamente negligenciada, que atinge toda América, estendendo-se entre a região sul do Chile e Argentina ao sul dos Estados Unidos (Figura 1). Estima-se que nesta região cerca de 90 milhões de pessoas estão expostas à doença (Coura, Dias, 2009) e que, só na América Latina, aproximadamente 10 milhões de pessoas se encontram infectadas (Urbina, 2010). Além disso, de acordo com Renslon e McKerrow (2006), cerca de 200.000 novos casos são reportados anualmente. Isto representa perda econômica de 6.500 milhões de dólares, o equivalente, em 1993, a 1,3% do déficit externo de todos os países da América do Sul (WHO, 2008) e torna a doença importante problema de Saúde pública (Schofield *et al.*, 2006).

Figura 1: Distribuição geográfica da doença de Chagas (Coura, Dias, 2009).

De acordo com Tanowitz e colaboradores (2011), a doença de Chagas tem sido reportada fora das áreas endêmicas. No Japão, encontram-se imigrantes brasileiros de origem japonesa e, em Barcelona, imigrantes bolivianos com a doença. Desta forma, segundo os autores, a conscientização quanto ao combate da parasitose torna-se um desafio global. Estratégias preventivas em transfusões de sangue e órgãos devem ser consideradas mesmo em países que não apresentem o problema.

No Brasil, até 1970, a transmissão da doença de Chagas era alta em 18 estados brasileiros. No final desta década, o total de pessoas infectadas por *T. cruzi* já era de aproximadamente 5 milhões. No entanto, a situação melhorou quando em 2006 o Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas foi capaz de interromper a transmissão vetorial da doença. Apesar do sucesso do programa nacional de controle da doença de Chagas, 3,5 milhões de pessoas no Brasil possuem a doença na forma crônica, o que significa que o diagnóstico e o cuidado a estes indivíduos devem ser mantidos (Barreto *et al.*, 2011).

A doença de Chagas caracteriza-se por uma fase inicial aguda, com sinais e sintomas quase sempre inespecíficos quando presentes, tais como febre pouco elevada, mal-estar, cefaléia, hipertrofia dos linfonodos, dentre outros, que pode evoluir,

num período superior a 10 dias, para a fase crônica, com comprometimento cardíaco (cardiopatia chagásica) (Rassi *et al.*, 2007). A cardiopatia chagásica é a mais importante forma de limitação ao doente chagásico e principal causa de morte (Rassi *et al.*, 2007), sendo este índice de até 80% após cinco anos de diagnóstico, acometendo principalmente homens com idade entre 30-40 anos (Barreto *et al.*, 2011).

A doença pode, também, ser assintomática, embora com alterações eletrocardiográficas, ou apresentar quadro de megaesôfago e megacólon, caracterizado por alterações ao longo do trato digestivo, ocasionadas por lesões dos plexos nervosos, com consequentes alterações da motilidade e morfologia do aparelho digestório (Ministério da Saúde, 2005).

1.1.2 Ciclo evolutivo do parasito

A transmissão da doença de Chagas é vetorial, através das fezes dos triatomíneos, também conhecidos como “barbeiros” ou “chupões”. Estes, em geral, defecam após o repasto sanguíneo, eliminando formas infectantes de tripomastigotas metacíclicos presentes em suas fezes, os quais penetram no hospedeiro pelo orifício da picada. No entanto, transmissão congênita, transfusional e por via oral também podem ocorrer (Ministério da Saúde, 2005).

O parasito penetra na pele do hospedeiro mamífero na forma tripomastigota metacíclico, o qual pode invadir os primeiros tipos celulares que encontrarem, como macrófagos, fibroblastos ou células epiteliais, entre outros (Figura 2). No interior destas células, os parasitos diferenciam-se em formas tripomastigotas, as quais são liberadas para o meio extracelular, e algumas outras formas intermediárias e amastigotas (estas últimas em menor proporção). Estas formas liberadas podem invadir novas células localizadas no sítio de infecção ou, ainda, atingir a corrente sanguínea e infectar outros tecidos do hospedeiro. A cinética deste processo varia de acordo com o tipo de cepa de *T. cruzi* e do animal infectado (Brener, 1973; Garcia, Azambuja, 1991; Fiocruz, 2008).

Figura 2: Ciclo evolutivo do parasito.

(<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>, acessado em 05/06/2008)

Durante a alimentação do inseto-vetor, as formas tripomastigotas encontradas no sangue do hospedeiro vertebrado infectado são ingeridas pelo inseto. Após alguns dias, estas formas se transformam em epimastigotas, as quais se dividem por divisão binária e aderem às membranas perimicrovilares das células intestinais, onde se diferenciam nas formas tripomastigotas metacíclicas. Estas últimas correspondem às formas que serão transferidas para o hospedeiro mamífero em novo repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo (Brener, 1973; Garcia, Azambuja, 1991; Fiocruz, 2008).

1.1.3 Quimioterapia

Atualmente, dois fármacos são utilizados no tratamento da doença de Chagas, nifurtimox e benznidazol (Figura 3), lançados em 1967 e 1972, respectivamente. No entanto, nenhum destes compostos mostra-se ideal para o tratamento porque ambos são eficazes apenas na fase aguda da doença. Estes compostos apresentam graves efeitos colaterais e ainda mostram grande variação na suscetibilidade sobre os isolados do parasito. Além disso, é crescente o número de populações de parasitos resistentes a ambos os compostos (Texeira, 2002; Astelbauer, Walochnik, 2011). No Brasil, só o benznidazol é utilizado.

Figura 3: (A) nifurtimox e (B) benznidazol.

Os dois fármacos são usados principalmente no tratamento de pacientes em fase aguda ou crônica recente (Teixeira, 2002; Werner *et al.*, 2008; Astelbauer, Walochnik, 2011). Resultados positivos são observados principalmente em crianças (Teixeira, 2002; Werner *et al.*, 2008).

Graves efeitos adversos são reportados para ambos os fármacos. No caso do benznidazol estas reações são divididas em três tipos: (A) de hipersensibilidade, tais como dermatite com erupção cutânea, aparecendo entre o sétimo e décimo dia de tratamento, febre, dores musculares e articulares; (B) insuficiência funcional da medula óssea, trombocitopenia e agranulocitose e (C) neuropatia e parestesia. Durante o tratamento com nifurtimox efeitos adversos como anorexia, perda de peso, náusea, vômito, cólicas intestinais, dentre outras podem ser observados (Astelbauer, Walochnik, 2011).

Em 1996, Chung obteve o derivado hidroximetilado do composto nitrofural (Figura 4), como um intermediário da síntese de pró-fármacos recíprocos da primaquina e nitrofural, potencialmente ativos em doença de Chagas. A atividade tripanomicida do composto matriz, nitrofural, foi observada pela primeira vez, em 1969, por Andrade e Brener. Posteriormente, Henderson e colaboradores (1988) verificaram a ação inibitória deste composto na enzima tripanotiona redutase. No entanto, o seu derivado, o hidroximetilnitrofural (NFOH), apresentou atividade superior sobre tripomastigotas e amastigotas em relação ao composto benznidazol (Chung *et al.*, 2003) e toxicidade quatro vezes inferior, quando comparado ao seu protótipo nitrofural (Guido *et al.*, 2001). Além da possível atividade sobre a enzima tripanotiona redutase, observou-se que o NFOH também inibe a enzima cruzipaína (IC_{50} igual a $10,55 \pm 0,81 \mu M$ para o NFOH e

de $22,83 \pm 1,2 \mu\text{M}$ para o nitrofural), por supressão da via metabólica dessa cisteíno-protease (Trossini *et al.*, 2009).

Figura 4: (A) nitrofural e (B) hidroximetilnitrofural.

Mais recentemente, Davies e colaboradores (2010) avaliaram a toxicidade do NFOH, do seu precursor nitrofural e do benznidazol em modelos murinos para doença de Chagas. Neste trabalho, quatro grupos com doze camundongos Swiss fêmeas receberam 150 mg/kg/dia de NFOH, 150 mg/kg/dia de nitrofural e 60 mg/kg/dia de benznidazol ou placebo. Verificou-se que os grupos tratados com NFOH apresentaram menor taxa de mortalidade (16%), seguido do benznidazol (33%), placebo (66%) devido à infecção por *T. cruzi* e nitrofural (75%). Além disso, o NFOH mostrou-se tão eficaz quanto o benznidazol, mantendo a parasitemia sanguínea em níveis não detectados por PCR (do inglês - *Polymerase Chain Reaction*). Os estudos histológicos mostraram que grupos tratados com NFOH apresentaram menor quantidade de parasitos infiltrados nos músculos esquelético e cardíaco. Verificou-se, ainda, ausência de lesões histológicas 180 dias após o final do tratamento, período a partir do qual os níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* são mais baixos.

1.2 LEISHMANIOSES

1.2.1 Doença e epidemiologia

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por 20 espécies diferentes de protozoários do gênero *Leishmania*. São transmitidas através da picada do mosquito-vetor do gênero *Phlebotomus*, nos países do velho mundo e *Lutzomyia*, nos países do novo mundo (WHO, 2008c) e podem compreender três manifestações

clínicas principais, dependentes da espécie de *Leishmania* infectante e da capacidade de resposta imune do hospedeiro (Soares-Bezerra *et al.*, 2004; WHO, 2008c):

(A) Visceral ou calazar, causada principalmente pela *L. donovani*, mas também pela *L. infatum* e *L. chagasi*. Acomete os órgãos internos e é caracterizada por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. Apresenta, aproximadamente, 100% de taxa de mortalidade em indivíduos não-tratados;

(B) Mucocutânea, causada pela *L. braziliensis* e caracterizada por lesões que destroem parcial ou totalmente a mucosa nasal e oral, gerando deformidades;

(C) Cutânea, causada pela *L. mexicana*, *L. tropicana* e *L. major*, compreendendo lesões ulcerativas em áreas expostas como braços, pernas e outras. No Brasil, os casos de leishmaniose cutânea e mucocutânea são ocasionados pelo gênero *L. braziliensis*.

No último relatório técnico (2010), a Organização Mundial de Saúde definiu a leishmaniose como “uma das doenças mais negligenciadas do mundo, que afeta principalmente os mais pobres dos pobres, principalmente nos países em desenvolvimento”. Apesar das grandes descobertas científicas no diagnóstico, o custo do tratamento ainda se mantém alto (WHO, 2010d)

Estima-se que 2 milhões de novos casos de leishmaniose ocorram anualmente e que, em todo o mundo, 12 milhões de pessoas estejam infectadas (Figura 5). No entanto, é importante salientar que o impacto da leishmaniose na saúde pública mundial encontra-se subestimado. De fato, a declaração da doença é compulsória em apenas 32 dos 88 países afetados pela parasitose, verificando-se, assim, número substancial de casos não registrados (WHO, 2008c).

Figura 5: Distribuição 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*. Em marrom: leishmaniose mucocutânea e visceral, em azul: leishmaniose cutânea.

Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html, acessado em 21/ 11/ 2011)

Dentre os tipos de manifestações clínicas, a leishmaniose visceral, popularmente conhecida como calazar, é a mais grave. Seus agentes causadores afetam cerca de 500 milhões de pessoas por ano, atingindo principalmente regiões da Índia, Sudão, Nepal, Bangladesh e países da América Latina (WHO, 2008e). A situação é mais crítica em pacientes imunodeprimidos, em que o parasito torna-se um importante agente oportunista. Tem-se relatado que a imunodepressão causada por infecções virais como o HIV aumentou o número de casos de leishmaniose visceral em países onde a doença é rara, como França, Itália, Espanha e Portugal (Desjeux, Alvar, 2003; Santos *et al.*, 2008). No caso de co-infecção a leishmaniose visceral é a mais propensa a se desenvolver nos pacientes infectados por HIV, prejudicando a resposta ao tratamento antirretroviral (WHO, 2010d).

O Brasil concentra cerca de 70% dos casos de leishmanioses na América do Sul (Barreto *et al.*, 2011). Nas últimas duas décadas, epidemias urbanas foram observadas em várias cidades (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006). A transmissão da *L.*

chagasi, antes restrita à área rural, vem mudando desde 1980, espalhando-se por áreas urbanas. Atualmente, várias cidades são afetadas, dentre elas as capitais Teresina, Belo Horizonte e Campo Grande. Além da rápida expansão urbana, aumenta, também, o número de cães de áreas rurais em contato com ciclos zoonóticos, em áreas urbanas. Isto os torna principais reservatórios da doença nestas regiões. Com relação ao vetor, a espécie *Lutzomyia longipalpis* também tem se adaptado bem ao ambiente peridomiciliar (Barreto *et al.*, 2011).

A expansão da epidemia tem ocasionado número elevado de óbitos. Observa-se que, nos últimos anos, a letalidade por leishmaniose visceral tem aumentado gradativamente, passando de 3,6%, em 1994, para 6,7%, em 2003, o que representa incremento de 85%. Além disso, a análise parcial dos dados em novembro de 2004 mostrou aumento de 26% na letalidade da doença (Figura 6) (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006). De acordo com Barreto e colaboradores (2011), o combate à infecção tem se focado no controle do vetor e no extermínio de animais que são reservatórios da doença.

Figura 6: Letalidade da leishmaniose visceral no Brasil, de 1994 a 2004 (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006).

1.2.2 Ciclo evolutivo do parasito

O ciclo de vida do parasito tem início com o repasto sanguíneo do mosquito flebotomíneo fêmea, o qual leva consigo formas amastigotas da *Leishmania*. Aproximadamente cinco dias após picar o hospedeiro vertebrado, as formas amastigotas adquiridas pelo mosquito flebotomíneo se transformam em promastigotas e

migram para as partes superiores do tubo digestório do inseto, atingindo o aparelho picador (Figura 7) (Chappuis *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008).

Figura 7: Ciclo evolutivo do parasito (Chappuis *et al.*, 2007).

Assim, ao picar outro animal, o mosquito flebotomíneo transfere ao hospedeiro vertebrado formas promastigotas metacíclicas da *Leishmania* infectante. Estas formas, compridas e flageladas (Figura 7), tendem a infectar as células do sistema fagocítico mononuclear do homem, especialmente macrófagos. No interior destes macrófagos, os promastigotas se transformam em amastigotas, forma esférica e sem flagelo, que se multiplicam no interior dos fagolisossomos e levam à lise da célula hospedeira. Com o rompimento do macrófago, ocorre a liberação de grande quantidade de parasitos na circulação sanguínea e infecção de outros macrófagos. É importante ressaltar que o estabelecimento da doença depende do sucesso do parasito em se diferenciar na forma amastigota (Santos *et al.*, 2008).

Embora tenham a capacidade de infectar uma variedade de células fagocitárias e não-fagocitárias, de acordo com o trabalho de Naderer e colaboradores (2004) o tropismo acentuado das *Leishmanias* na forma promastigota por macrófagos deve-se à presença de um glicocálice espesso, formado por proteínas ancoradas nas moléculas de glicosilfosfatidilinositol, fosfoglicanos, lipofosfoglicanos e outros glicolipídeos.

Considerando que leishmanias ligam-se a superfície dos macrófagos e estimulam sua própria fagocitose, Hsiao e colaboradores (2011) realizaram trabalho para verificar como ocorre a interação e fagocitose da espécie *Leishmania infantum chagasi* em 2 linhagens de células humanas diferentes: U937 e MDMs. Este estudo demonstrou que cada um dos tipos celulares apresentou particularidades, tais como: orientação dos pseudópodes durante a fagocitose, tipos de mediadores químicos envolvidos, adesão do parasito à superfície do macrófago, localização e maturação do vacúolo parasitóforo e diferenças na replicação intracelular do parasito. Estes resultados revelaram diferenças importantes quanto ao tipo de fagocitose e primeiros estágios de internalização da *Leishmania infantum chagasi*, os quais podem ser determinantes ou não para que a infecção seja estabelecida.

McConville e colaboradores (2007) realizaram a análise de leishmanias mutantes na ausência de um ou mais componentes do glicocálice. Este estudo indicou a importância dos lipofosfoglicanos na infecção de macrófagos, enquanto que a perda de outros componentes da superfície da membrana do parasito teria pouca influência sobre a virulência da forma promastigota em hospedeiros mamíferos. Além disso, sabe-se que a presença de lipofosfoglicanos nas formas promastigotas de *L. major* proporciona proteção contra o aumento de espécies oxigenadas geradas durante a fagocitose (Spath *et al.*, 2003). No entanto, é importante considerar que diferenças específicas entre espécies podem ocorrer, como por exemplo, os lipofosfoglicanos das formas promastigotas da espécie *L. mexicana* não são necessários para virulência e, ainda assim, estas espécies são mais resistentes ao estresse oxidativo que outras espécies como *L. major* ou *L. donovani* (Wanasen *et al.*, 2007).

Recentemente, Osanya e colaboradores (2011) realizaram estudo para determinar a capacidade das subunidades de açúcares presentes no glicocálice dos gêneros *Leishmania* e *Mycobacterium* em alterar a resposta imune inata. Sabe-se que unidades de oligossacarídeos constituem o lipofosfoglicano e a lipoaribinomanana do glicocálice da *Leishmania* e do *Mycobacterium*, respectivamente. Neste estudo utilizaram-se oligossacarídeos formados por duas e três unidades de manose e o monômero galactose. O dissacarídeo lactose foi usado como controle. Verificou-se que o oligossacarídeo formado por três moléculas de manose foi capaz de aumentar a

produção de células Th1, as quais estão envolvidas na produção de interleucina IL-12p40 e produção da resposta imune a qualquer patógeno. Este trabalho demonstrou que o tipo de inflamação bem como a entrada de patógenos em macrófagos e células dendríticas revestidas por trimanose e outros oligossacarídeos foi diferente. Isto poderia indicar interações diferentes entre os ligantes e a família de receptores de lectina tipo C, dentre eles o receptor de manose, presentes em células fagocíticas.

1.2.3 Quimioterapia

O controle das leishmanioses baseia-se em medidas profiláticas de combate ao vetor e no extermínio de cães infectados, que são reservatórios de parasitos em áreas peridomiciliares, bem como no tratamento dos indivíduos infectados (Soares-Bezerra *et al.*, 2004). Os medicamentos disponíveis no mercado atualmente apresentam como principais problemas a elevada toxicidade e os efeitos adversos (Singh, Sivakumar, 2004), bem como o fato de serem administrados por via parenteral (Soares-Bezerra *et al.*, 2004), o que dificulta o tratamento, levando ao abandono da maioria dos pacientes, e favorece o aparecimento de cepas resistentes (Singh, Sivakumar, 2004; Soares-Bezerra *et al.*, 2004).

O tratamento de primeira escolha desta parasitose consiste nos antimonialis pentavalentes, principalmente o estibogliconato de sódio e o antimoniato de meglumina (Figura 8), disponíveis na terapêutica desde 1940 (Santos *et al.*, 2008; Tiuman *et al.*, 2011). O mecanismo de ação destes fármacos ainda não foi elucidado (Santos *et al.*, 2008). Acredita-se que, no interior do parasito, estes compostos sejam reduzidos a forma trivalente e que a atividade pode estar relacionada com o bloqueio dos mecanismos de glicólise e degradação de ácidos graxos (Astelbauer, Walochnik, 2011). Além disso, algumas particularidades químicas desta classe podem estar envolvidas em diversos aspectos do metabolismo do parasito. Por exemplo, os carboidratos, como o ácido glicônico presente na glucamina, são capazes de formar complexos solúveis em água com o átomo antimônio, o que pode favorecer a distribuição dos agentes antimonialis para macrófagos infectados (Santos *et al.*, 2008).

Alguns dos efeitos adversos mais frequentes são cardiotoxicidade, pancreatite em pacientes com HIV, bem como anemia, leucopenia, dores de cabeça, náuseas, vômitos e mialgia, entre outros. O tratamento dura em torno de 20 dias para leishmaniose cutânea e de 28 dias para leishmaniose visceral (Astelbauer, Walochnik, 2011).

Figura 8: (A) estibogliconato de sódio e (B) antimoniato de meglumina.

Em casos de resistência, a pentamidina, da classe das diaminas aromáticas, a anfotericina B e a paromomicina (Figura 9), antibióticos poliênico e aminoglicosídeo, respectivamente, são utilizados como fármacos de segunda escolha, apesar da elevada toxicidade (Santos *et al.*, 2008; Astelbauer, Walochnik, 2011; Tiuman *et al.*, 2011).

Figura 9: (A) Pentamidina, (B) anfotericina B e (C) paromomicina.

Com relação ao mecanismo de ação destes últimos, as diaminas aromáticas, como a pentamidina, agem interferindo na síntese das poliaminas, moléculas que regulam o crescimento e a diferenciação celular, por inibição das enzimas ornitina decarboxilase e espermidina sintetase. Além disso, estas moléculas são capazes de se ligar ao DNA, em regiões ricas em sequências adenina-timina. No entanto, apesar de ser um fármaco de segunda escolha, a resistência à pentamidina também já é descrita (Bray *et al.*, 2003). Dificuldades no tratamento de pacientes imunodeprimidos, com AIDS, por exemplo, cuja quimioterapia convencional é menos eficaz, também são descritas, exigindo, assim, doses mais elevadas e período de tratamento mais extenso. Além disso, a pentamidina tem sido utilizada apenas nos casos de leishmaniose cutânea devido à toxicidade resultante do tratamento em longo prazo necessário na leishmaniose visceral (Astelbauer, Walochnik, 2011). Por estas razões, tem sido cada vez maior a busca por novos fármacos mais eficientes e com toxicidade reduzida (Santos *et al.*, 2008).

Diferentemente, a anfotericina B interage com a molécula de ergosterol, principal constituinte da membrana plasmática de *Leishmania* e fungos, promovendo alterações na permeabilidade da membrana e desequilíbrio osmótico do parasito (Santos *et al.*, 2008). Em adição, este fármaco estimula a produção de citocinas e, portanto, aumenta a atividade de macrófagos. O índice de cura dos pacientes infectados é superior a 90%, mas casos de resistência à anfotericina B têm sido reportados em pacientes

coinfectados com HIV e *L. infantum* e que apresentam recaídas sucessivas (Di Giorgio *et al.*, 1999; Astelbauer, Walochnik, 2011).

No caso da paromomicina, o mecanismo de ação se deve à inibição da síntese protéica, por se ligar às proteínas ribossômicas, induzindo, assim, a leitura errada do RNA mensageiro (Santos *et al.*, 2008). Apesar da baixa absorção por via oral, este fármaco é o único da classe dos aminoglicosídeos que apresenta atividade leishmanicida (Tiuman *et al.*, 2011). Este problema motivou o desenvolvimento de formulações tópica (Ben Salah *et al.*, 1995) e parenteral (Sundar *et al.*, 2007) para as formas cutânea e visceral, respectivamente (Tiuman *et al.*, 2011).

Outro composto utilizado na terapêutica é a hexadecilfosfocolina, ou miltefosina, uma alquilfosfocolina formadora de micela, desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer. Este fármaco vem sendo utilizado na Índia para o tratamento das leishmanioses refratárias ao tratamento convencional com antimoniais, apresentando resultados bastante promissores. Evidências da morte por apoptose têm sido demonstradas em promastigotas de *L. donovani* tratados com miltefosina. Porém, a forma como estes agentes induzem apoptose, tanto em células de mamíferos como em parasitas, não é completamente conhecida. A hipótese atual baseia-se na inibição da síntese de fosfatidilcolina, elemento essencial para a síntese e integridade das membranas celulares e fonte de moléculas de sinalização (Wright *et al.*, 2004). O índice de cura já documentado foi de 94%, superior aos demais fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose (Olliaro *et al.*, 2005; Astelbauer, Walochnik, 2011). No entanto, muitos efeitos adversos estão relacionados ao uso deste fármaco, tais como vômitos, diarréias, aumento do nível sanguíneo das transaminases, uremia e creatininemia (Soares-Bezerra *et al.*, 2004). Além disso, existem preocupações com o desenvolvimento da resistência, uma vez que esta pode ser estabelecida facilmente em cepas *in vitro* (Seifert *et al.*, 2003; Astelbauer, Walochnik, 2011). Os mecanismos de resistência podem estar relacionados com o efluxo do fármaco, a diferença na permeabilidade da membrana plasmática e o metabolismo elevado (Pérez-Victoria *et al.*, 2006; Tiuman *et al.*, 2011).

É importante ressaltar que o uso de leishmanicidas nanoparticulados apresenta vantagens no contexto das doenças parasíticas (Tiuman *et al.*, 2011). Atualmente,

estes compostos formulados em lipossomos são alternativas para reduzir os respectivos efeitos adversos, bem como aumentar a eficiência e a concentração destes últimos nos tecidos (Santos *et al.*, 2008). Exemplos deste tipo são as formulações lipossômicas comerciais de anfotericina B, o Ambisome[®] e o Abelcet[®]. No entanto, o preço elevado destas formulações dificulta a utilização destes medicamentos pelos países em desenvolvimento (Golenser *et al.*, 1999). Assim, estudos foram realizados por Larabi e colaboradores (2003) para tentar diminuir o custo da produção destas formulações. Neste trabalho, uma nova formulação com composição lipídica similar ao Abelcet[®], mas com diferenças na conformação e massa molecular, que poderia influenciar a liberação do fármaco no organismo, foi testada. A nova formulação mostrou-se 27% mais eficiente e menos tóxica que o Abelcet[®] *in vivo* e *in vitro*, apesar da menor eficácia deste produto quando comparado ao Ambisome[®].

Em outro trabalho, Pal e colaboradores (2004) descreveram o uso combinado de antimoniais e gliconato de sódio em lipossomos, com a finalidade de aumentar a eficácia destes fármacos. Verificou-se que esta combinação reduziu em 98% a presença dos parasitos no fígado de ratos e em 97% no baço, quando comparados à monoterapia (76 e 65%, respectivamente), além de proporcionar, também, diminuição dos efeitos adversos e erradicação total dos parasitos após três meses de tratamento.

1.2.4 Profilaxia

Recentemente, Danesh-Bahreini e colaboradores (2011) realizaram estudo para verificar a eficiência de vacina contendo antígeno recombinante *Leishmania* superóxido dismutase B1 (SDB1) incorporado a nanopartículas de quitosana. A enzima superóxido dismutase funciona como antioxidante, protegendo a célula dos efeitos nocivos do superóxido. Desta maneira, SDB1 mostrou-se efetivo na erradicação da *Leishmania*.

Além disso, o primeiro acordo com o Brasil como parte do programa *Trust in Science*, uma parceria entre a indústria GlaxoSmithKline (GSK) e a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), para pesquisa e desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, prevê que cientistas envolvidos compartilhem

novas pesquisas e conhecimentos sobre doenças como leishmanioses, doença de Chagas, além de malária e tuberculose (GSK, 2010; CNPq, 2011).

1.3 PRODUTOS NATURAIS COMO ANTIPARASITÁRIOS

Muitos compostos bioativos de origem natural têm sido isolados e utilizados como precursores de novos fármacos na terapêutica (Itokawa *et al.*, 2008; Uchiyama, 2008). Dentre os princípios ativos oriundos da natureza, os ácidos anacárdicos da família Anacardiaceae e gênero *Anacardium*, constituem cerca de 90% da composição do líquido extraído da casca da castanha de caju (*A. occidentale*) (Agostini-Costa *et al.*, 2004). Estes consistem em mistura de ácidos 6-alkil-salicílico, em que os grupos alquílicos variam quanto ao comprimento da cadeia e grau de insaturação (Correia *et al.*, 2006).

Nos últimos anos série de atividades biológicas para os ácidos anacárdicos foi descoberta (Correia *et al.*, 2006). Além da atividade antitumoral, destaca-se a capacidade de inibir enzimas, como tirosinase (Kubo *et al.*, 1994), prostaglandina sintase e lipoxigenase (Paramashivappa *et al.*, 2001). Estes ácidos também são conhecidos por suas atividades antibacteriana (Kubo *et al.*, 1993), moluscocida (Sullivan *et al.*, 1982), antifúngica (Prithiviraj *et al.*, 1997), antimalárica (Cui *et al.*, 2008) e tripanomicida (Pereira *et al.*, 2008). Pereira e colaboradores, em 2008, investigaram a atividade do extrato do *Anacardium occidentale* sobre a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) do *T. cruzi*. Esta enzima está envolvida na via glicolítica do parasito, catalizando a forforilação oxidativa do gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato em presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e fosfato inorgânico. Desta maneira, a GAPDH desempenha papel importante no controle da produção de ATP em parasitos patogênicos tais como *T. cruzi*, *T. brucei* e leishmanias. Considerando que amastigotas intracelulares dependem da produção de ATP por glicólise, a inibição desta enzima poderia ser relevante para a atividade destes parasitos e, por esta razão, a GAPDH tem sido considerada importante alvo no desenvolvimento de fármacos.

De acordo com os resultados, a mistura de ácidos anacárdicos contendo diferentes insaturações na cadeia alquílica foi capaz de inibir, em 80%, 1 mg/mL da enzima GAPDH. O passo seguinte deste trabalho foi reduzir por hidrogenação as duplas ligações dos diferentes componentes da mistura, obtendo novos derivados. Dentre os 21 compostos avaliados, o derivado 1, ácido anacárdico reduzido (Figura 10), foi o mais ativo, apresentando menor valor de IC_{50} (28 μM). Verificou-se, também, que este composto inibia a enzima mesmo na presença dos substratos naturais, gliceraldeído 3-fosfato e NAD, sendo considerado inibidor não competitivo.

Figura 10: Estrutura do ácido anacárdico reduzido.

Outro conjunto de compostos de grande ocorrência na natureza são as lactonas sesquiterpênicas, as quais representam importante grupo de metabólitos secundários da família *Asteraceae* (Baruah *et al.*, 1994). Devido ao amplo espectro de atividade biológica, as lactonas sesquiterpênicas também constituem uma classe de substâncias com potencial para utilização na medicina (Barbosa *et al.*, 2002), destacando-se as atividades citotóxica e antitumoral (Arnason *et al.*, 1987), antibacteriana (Picman, 1986), antiinflamatória (Abad *et al.*, 1994), esquistossomicida (Martins *et al.*, 2000), antimalárica (Sülzen *et al.*, 2011), antifúngica (Picman, 1986) e tripanomicida (Schmidt *et al.*, 2002).

Schmidt e colaboradores (2002) avaliaram a atividade *in vitro* de seis lactonas sesquiterpênicas, helenalina (Figura 11), seu isômero mexicanina e derivados, frente aos parasitos *T. brucei rodhesiense* e *T. cruzi*. Desta série de compostos, a helenalina apresentou atividade superior (IC_{50} 0,051 μM sobre *T. b. rodhesiense* e 0,695 μM sobre *T. cruzi*). O segundo derivado mais ativo foi a mexicanina, que apresentou valor de IC_{50} de 0,318 μM sobre *T. b. rodhesiense* e de 1,870 μM sobre *T. cruzi*. A helenalina também apresentou seletividade sobre os parasitos, com toxicidade 20 vezes maior

para *T. brucei*, em relação a células de mamíferos. No entanto, aumento da seletividade destes compostos ainda é desejado.

Figura 11: Estrutura da lactona sesquiterpênica helenalina.

Barrera e colaboradores (2008) também avaliaram a atividade das lactonas sesquiterpênicas helenalina, diidroleucodina e mexicanina sobre *Leishmania mexicana*, causadora da forma cutânea da leishmaniose. Observou-se que estes compostos foram capazes de inibir rapidamente o crescimento *in vitro* dos parasitos mesmo em concentrações baixas (IC_{50} entre 2 e 4 μM) e de maneira irreversível. Os compostos exerceram efeito citostático após 3 horas de exposição, o que poderia indicar, segundo os autores, ação sobre proteínas ou outros elementos cruciais no ciclo de vida do parasito. O composto helenalina induziu forte vascularização no citoplasma do parasito, embora os microtúbulos pericelulares tenham sido preservados. Além disso, estes compostos apresentaram baixa toxicidade frente a células de mamíferos. As três lactonas induziram fragmentação do DNA, a qual pôde ser visualizada por marcação com método fluorescente e confirmada por eletroforese em gel de agarose. Os autores acreditam que os compostos possam exercer ativação do mecanismo apoptótico, embora efeitos causados por necrose também não devam ser menosprezados. A habilidade dos parasitos em invadir células Vero também foi diminuída pela exposição em baixas concentrações dos compostos. Dessa maneira, os autores concluíram que as três lactonas sesquiterpênicas testadas podem afetar o ciclo de vida da *L. mexicana*, possivelmente por afetarem mecanismos celulares múltiplos.

1.4 RECEPTOR DE MANOSE

Os macrófagos são componentes celulares essenciais para o sistema de defesa, apresentando importantes funções na imunidade inata e adquirida. Como participantes da imunidade inata, os macrófagos protegem o hospedeiro durante a primeira fase da infecção por possuírem receptores de reconhecimento padrão (RRP), que identificam padrões moleculares associados a patógenos (PMAP) tais como carboidratos, peptídeos e lipoproteínas. Os RRP são responsáveis pela ação fagocitária dos macrófagos e regulam a ação antimicrobiana destes últimos por meio da expressão de genes (Gough, Gordon, 2000; Li, Glass, 2002).

A ideia de receptores expressos em macrófagos surgiu pela primeira vez em 1979, no trabalho publicado por Goldstein e colaboradores. Neste trabalho, os autores identificaram funcionalmente os receptores dos macrófagos pela capacidade em se ligar, preferencialmente, a lipoproteínas de baixa densidade (LDL), por exemplo, LDL oxidada ao invés da LDL não oxidada. Atualmente, são conhecidas diversas classes de receptores de macrófagos, os quais se dividem de acordo com o tipo de domínio transmembrana do receptor (Murphy *et al.*, 2005; Areschoug, Gordon, 2009) ou tipo de ligante, tais como proteínas chaperonas, proteínas da matriz extracelular, lipoproteínas não modificadas, entre outras (Plüddemann *et al.*, 2007; Areschoug, Gordon, 2009). Exemplos de tipos e subtipos de receptores expressos pelos macrófagos são os do tipo A (AI, AII e AIII), B (BI e CD36), C (*Drosophila*) (Jagiello *et al.*, 2006), bem como o receptor de manose.

O receptor de manose pertence à superfamília de receptores da lectina tipo C, que inclui o receptor para fosfolipase A₂ tipo M (mPLA₂R), o DEC205 e o Endo-180. Como o próprio nome indica, os receptores desta família caracterizam-se pela presença de múltiplos domínios transmembrana de lectina tipo C dentro de uma cadeia polipeptídica simples (Gazi, Martinez-Pomares, 2006).

Além dos macrófagos, o receptor de manose é expresso, também, em células dendríticas, células hepáticas, endotélio linfático e células mesangiais (rins). Este receptor apresenta três domínios extracelulares responsáveis pelo reconhecimento de ligantes endógenos e exógenos: um domínio rico em cisteína N-terminal, capaz de se

ligar a açúcares sulfonados, sendo independente de cálcio (Taylor *et al.*, 2005), um domínio de fibronectina tipo II, envolvido no reconhecimento dos vários subtipos de colágeno (Martinez-Pomar *et al.*, 2006; Napper *et al.*, 2006), e um terceiro domínio denominado *C-type lectin like domain* (CTLDD), o qual é dependente de cálcio e reconhece açúcares terminados em *D*-manose, *L*-fucose e *N*-acetilglicosamina (Taylor *et al.*, 2005). O domínio CTLDD pode interagir também com ligantes de origem microbiana como a manose, encontrada na superfície de muitos microorganismos e considerada um RRP. Dentre os patógenos reconhecidos por este receptor incluem-se *T. cruzi* (Kahn *et al.*, 1995), *Candida albicans* (Martinez-Pomares *et al.*, 1998), *Leishmania* (Chakraborty *et al.*, 2001), *Mycobacterium tuberculosis* (Tailleux, 2003), HIV (Nguyen, Hildreth, 2003), vírus da dengue (Miller *et al.*, 2008), dentre outros.

Atualmente, a função do receptor de manose na defesa do hospedeiro ainda não é bem entendida. Estudo em ratos deficientes deste receptor mostrou que, em infecção causada por *C. albicans*, estes animais não se mostravam mais suscetíveis à doença (Lee *et al.*, 2003). Porém, o mesmo estudo realizado com *P. carinii* (Swain *et al.*, 2003) e *Leishmania* (Akilov *et al.*, 2007) mostrou aumento do número de macrófagos deslocados para área de infecção maior que em animais contendo receptor de manose em suas células, indicando que a ausência deste receptor poderia diminuir a eficiência dos macrófagos. Outros estudos demonstraram ser o receptor de manose essencial para produção de citocinas pró e antiinflamatórias, bem como um mediador da sinalização intracelular (Martinez-Pomares *et al.*, 2003; Wainszelbaum *et al.*, 2006).

Uma vez que os macrófagos encontram-se na circulação sanguínea e em diversos tecidos e por estarem envolvidos em série de doenças, estas células representam importante alvo na busca por novos compostos mais específicos. Em 2003, com o objetivo de obter compostos ativos para leishmaniose, Medda e colaboradores sintetizaram diferentes lipossomos (fosfatidiletanolamina: colesterol: diacetil fosfato e ácido poliglicólico: fosfatidiletanolamina), divididos em dois grupos: aqueles que possuíam manose na superfície do lipossomo e aqueles que não possuíam. Medida a atividade, verificou-se diminuição da parasitemia no baço e fígado em ambos os grupos, sendo esta diminuição mais acentuada para os compostos manosilados. Posteriormente, com objetivo de combater fibrose hepática, Adrian e

colaboradores (2007) desenvolveram lipossomos contendo moléculas de manose 6-fosfato na superfície com o objetivo de direcioná-los às células de Kupfer. A atividade foi medida comparando-os com lipossomos sem o grupo transportador. Verificou-se maior eficácia dos compostos manosilados, os quais foram capazes de inibir a expressão gênica de colágeno, evitando, assim, o desenvolvimento da fibrose.

Outro trabalho (Vyas *et al.*, 2010) indicou que lipossomos manosilados são promissores sistemas de transporte de proteínas, peptídeos ou ácidos nucleicos. Neste estudo, lipossomos manosilados aumentaram o direcionamento intracelular de compostos imunogênicos para macrófagos e células dendríticas. A atividade imunogênica dos lipossomos foi estudada mensurando a produção de anticorpos em presença de antígenos específicos, através da administração subcutânea de diferentes formulações lipossômicas em camundongos BALB/c. Verificou-se que lipossomos revestidos com manana-O-palmitoil apresentaram absorção mais eficiente. Além disso, os estudos *in vivo* indicaram resposta significativamente maior de anticorpos séricos e respostas celulares T CD4⁺ (TH1 e TH2) mais fortes. Desta forma, lipossomos manosilados podem ser úteis na interação com células apresentadoras de antígenos.

Recentemente, Al-Hallack e colaboradores (2011) utilizaram microcalorimetria isotérmica (MCIT) para detectar diferenças fagocíticas na interação entre nanopartículas e macrófagos. Por esta técnica analítica é possível mensurar trocas de calor, o que permite monitorar reações químicas, físicas e biológicas. Para isso os autores utilizaram quatro formulações diferentes de nanopartículas de poliisobutil cianoacrilato e de gelatina, as quais foram revestidas ou não com manose e polissorbato 80. Dessa maneira, macrófagos alveolares foram cultivados em placas de vidro e inseridos no aparelho de MCIT. A atividade térmica das células foi medida na ausência e presença de 100 µL de cada uma das nanopartículas. O controle foi realizado utilizando citocalasina B, um inibidor da fagocitose. Os resultados indicaram que atividade térmica produzida pelos macrófagos mudou de acordo com cada nanopartícula: gelatina manosilada apresentou maiores trocas de calor $75,4 \pm 7,5$ J e aquelas revestidas com polissorbato 80 apresentou valores mais baixos $15,2 \pm 3,4$ J. Citocalasina B inibiu a resposta dos macrófagos indicando relação entre atividade térmica mensurada e fagocitose das nanopartículas.

Moléculas de manose como transportadores têm sido usadas, ainda, em diversas outras doenças tais como AIDS (Ni *et al.*, 2006), hepatite B (Jain, Vyas, 2005), neoplasias (Ikehara, Kojima, 2007), dentre outras.

1.5 PLANEJAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

1.5.1 Latenciação

O termo latenciação consiste na transformação do fármaco em forma de transporte inativo, denominado genericamente de pró-fármaco, que, *in vivo*, mediante reação química, enzimática ou ambas, libera a porção ativa (fármaco matriz) no local de ação ou próximo dele (Han, Amidon, 2000; Chung *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005) (Figura 12).

Figura 12: Ilustração simplificada do conceito de pró-fármaco (Huttunen *et al.*, 2011).

Wermuth, em 1984, classificou as formas latentes em pró-fármacos e fármacos dirigidos. Os pró-fármacos foram classificados em: *clássicos*, que, como o próprio nome indica, seguem a definição clássica da latenciação, ou seja, só se tornam ativos após hidrólise química ou enzimática; *bioprecursores*, que liberam os fármacos após ação de enzimas, normalmente, não-hidrolíticas e não apresentam transportadores; *mistos*, com

características de pró-fármacos clássicos e bioprecusores. O sistema CDS (*Chemical Delivery System*), em que o transportador é inicialmente oxidado, é exemplo desse tipo; *recíprocos*, nos quais, diferentemente dos pró-fármacos clássicos, o transportador também apresenta atividade terapêutica e os *fármacos dirigidos*.

Fármacos *dirigidos* são formas latentes em que os fármacos ou substâncias bioativas são ligados a um transportador específico, que leva em conta a especificidade celular com base em um tipo de receptor ou enzima, reduzindo, assim, a ação do fármaco em outras regiões do organismo (Wermuth, 2008; Silva *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2005).

Desde 1960, o uso de pró-fármacos na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos tem aumentado. Esse avanço foi maior no início do século XXI, quando se tornou essencial o planejamento das propriedades físico-químicas dos novos compostos. Em 2008, 33% dos fármacos com baixa massa molecular aprovados na terapêutica eram pró-fármacos e em 2009, quase 15% dos fármacos com baixa massa molecular mais vendidos no mundo eram pró-fármacos. Atualmente 10% dos fármacos que estão no mercado são pró-fármacos e dezenas deles encontram-se em ensaio clínico (Stella *et al.*, 2010; Huttunen *et al.*, 2011).

Entre os diversos tipos de fármacos latentes, os ésteres são os mais comuns e estima-se que representem cerca de 49% de todos os produtos deste tipo disponíveis no mercado. São utilizados frequentemente para aumentar a lipofilicidade do fármaco em questão, por mascararem grupos ácidos carboxílicos e fosfatos, permitindo a passagem de compostos através das membranas. Uma vez no organismo, as ligações ésteres são hidrolisadas por esterases (carboxilesterases, acetilcolinesterases, paraoxonases, entre outras), encontradas na corrente sanguínea, fígado e em outros órgãos e tecidos (Rautio *et al.*, 2008).

A latenciação mostra-se como estratégia bem definida para aperfeiçoar propriedades físico-químicas, farmacotécnicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas de compostos farmacologicamente ativos e, portanto, melhorar a utilidade do fármaco em questão (Rautio *et al.*, 2008). Desta forma, pró-fármacos superam problemas como (A) baixa biodisponibilidade; (B) tempo de ação curto; (C) alta toxicidade; (E) baixa

seletividade; (F) instabilidade química e (G) propriedades organolépticas indesejáveis (Chung *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005).

1.5.2 Micelas

Dentre os diversos processos envolvidos na aplicação da latenciação, o uso de macromoléculas como transportadores para prolongar a ação e, conseqüentemente, diminuir a toxicidade de um fármaco tem sido crescente (Chung *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Haag, Kratz, 2006; Bromberg, 2008; Oh *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2008; Parveen *et al.*, 2011). Desta forma, nanopartículas como transportadores de fármacos (nanotransportadores), tais como lipossomos, micelas poliméricas, nanocápsulas, dentre outros, são usados com a finalidade de controlar e corrigir as propriedades biológicas do fármaco, permitindo que este desempenhe suas funções terapêuticas (Rangel-Yagui *et al.*, 2005; Torchilin, 2009).

Os nanotransportadores retêm os princípios ativos, protegendo-os da eliminação ou degradação rápida *in vivo*. Isto proporciona a menor concentração do fármaco livre na circulação sanguínea, prolongando sua presença no organismo, o que pode levar à potenciação da ação biológica, assim como à redução de efeitos colaterais. Além disso, os nanotransportadores apresentam como principais características: (A) capacidade de se acumular em locais específicos ou não específicos da zona patológica requerida, (B) resposta em direção aos estímulos fisiológicos locais, tais como mudanças de pH e temperatura associadas a patologias, resultando, por exemplo, na liberação acelerada do fármaco em tais regiões, (C) permitir a liberação efetiva e intracelular do fármaco, mesmo no interior de organelas. Além disso, podem ser utilizados como agentes de contraste para várias modalidades de imagem, tais como ultrassonografia e tomografia computadorizada (Torchilin, 2006, 2009).

De maneira geral, os nanotransportadores são capturados por macrófagos do sistema mononuclear fagocitário, principalmente do fígado, do baço e da medula óssea. Portanto, a administração de fármacos em nanotransportadores resulta no aumento de sua concentração nesses órgãos, assim como na redução da concentração em órgãos contendo capilares contínuos. A captura celular dos nanotransportadores é favorecida

pelo processo de opsonização, que ocorre assim que estes entram em contato com os componentes do sangue. Depois da fagocitose, esses transportadores são degradados por enzimas lisossômicas e a substância é liberada nos fagolisossomos, podendo se difundir para o citosol ou ser excretada para o meio extracelular (Moghimi *et al.*, 2001; Haag, Kratz, 2006).

Dentre os vários tipos de nanotransportadores, as micelas são dispersões coloidais, formadas por tensoativos (moléculas com duas regiões distintas e afinidades opostas ao solvente: uma apolar e outra polar), capazes de micelizar sob determinadas condições de concentração e temperatura. Normalmente, micelas apresentam tamanho de partícula entre 5 a 50-100 nm. Em baixas concentrações, estas moléculas anfifílicas existem separadamente, entretanto, com o aumento da concentração e a partir de um determinado valor (concentração micelar crítica - CMC), os agregados são formados (Torchilin, 2001; Rangel-Yagui *et al.*, 2005; Oerlemans *et al.*, 2010).

Dentro desta classificação, as micelas poliméricas (Figura 13) representam uma classe especial de micelas, formada por copolímeros, que consistem na junção de unidades monoméricas hidrofóbicas e hidrofílicas (Haag, Kratz, 2006; Torchilin, 2001). A principal força diretora para a autoassociação dos polímeros é dada pela diminuição da energia livre do sistema devido à remoção dos fragmentos hidrofóbicos do meio aquoso para o centro da micela e estabilizada pela exposição da porção hidrofílica à água (Torchilin, 2007). Forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio são responsáveis pela estabilidade entre as unidades hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente (Oerlemans *et al.*, 2010).

Figura 13: Esquema da formação de uma micela polimérica (Torchilin, 2001).

As micelas poliméricas são mais estáveis que as formadas por tensoativos, podendo reter o fármaco por período maior (Haag, Kratz, 2006). Em geral, micelas poliméricas apresentam CMC muito menor que tensoativos com baixa massa molecular. A CMC de micelas poliméricas é tipicamente da ordem de 10^{-6} a 10^{-7} M, enquanto que a CMC de tensoativos com baixa massa molecular é de 10^{-3} a 10^{-4} M. Por essa razão, as primeiras mantêm-se estáveis em baixas concentrações tornando-as relativamente insensíveis à diluição. Isto resulta em maior tempo de circulação, quando comparadas àquelas formadas por tensoativos (Oerlemans *et al.*, 2010).

De maneira inovadora, em 2008, Choi e colaboradores, prepararam micelas poliméricas de anfotericina B encapsulada em moléculas de dextrano ligado a poli(ácido láctico-co ácido glicólico). Estas apresentaram partículas de tamanho médio de 30 a 150 nm e para as micelas poliméricas sem o fármaco, o tamanho médio foi de 100 nm. A taxa de liberação do fármaco mostrou-se mais baixa com o aumento da quantidade de fármacos, bem como com o aumento da cadeia de poli(ácido láctico-co ácido glicólico).

É importante que o tempo de meia-vida do transportador na circulação seja longo o suficiente para promover o efeito de acúmulo e retenção, bem como que a internalização deste pelas células-alvo possa ocorrer de forma rápida o suficiente de modo a não permitir a degradação do mesmo e a consequente perda do fármaco no espaço intersticial (Sawant *et al.*, 2006). Com esta finalidade, grande variedade de moléculas, como anticorpos, oligossacarídeos, lectinas, hormônios e ácidos nucleicos, têm sido usados como ligantes com a finalidade de direcionar a ação dos nanotransportadores (Basu, 2005; Parveen *et al.*, 2011).

Sabe-se que o principal obstáculo para esse tipo de transportadores é o rápido acúmulo em macrófagos do sistema reticuloendotelial, uma vez que estes compostos são planejados para se manter na circulação por longo período. No entanto, com relação às leishmanioses, esta característica pode representar uma excelente vantagem, uma vez que esta doença é primariamente associada a macrófagos do sistema reticuloendotelial. Neste caso, esforços têm sido feitos para promover a maior entrada de compostos ativos, através da ligação ou incorporação de grupos facilmente reconhecíveis por receptores localizados nos macrófagos (Basu, 2005).

1.5.2.1 Pró-fármacos micelares

Em trabalho realizado por Silva e colaboradores (2001), pró-fármacos formadores de micela da isoniazida foram sintetizados. A isoniazida é um dos fármacos de escolha para o tratamento da tuberculose, podendo ser utilizada em associação com a rifampicina e pirazinamida, por um período de 6 meses a um ano. No entanto, este fármaco apresenta significativo efeito de primeira passagem, sendo metabolizado no fígado pela enzima *N*-acetiltransferase em *N*-acetilisoniazida. Assim, com o objetivo de aumentar o tempo de ação da isoniazida, esta foi ligada covalentemente aos polímeros polietilenoglicol e poli(ácido aspártico). As micelas foram testadas em culturas *in vitro* de *M. tuberculosis* e comparadas ao fármaco isolado. Este apresentou concentração inibitória mínima igual a 0,2 µg/mL enquanto que as micelas mostraram valores iguais a 0,8 µg/mL. Considerando que a micela contém 0,036 µg/mL de isoniazida (65% de substituição), é possível verificar aprimoramento de 5,6 vezes da ação tuberculostática com a obtenção do pró-fármaco micelar da isoniazida.

Posteriormente, pró-fármacos micelares da pirazinamida foram sintetizados utilizando, também, polímeros de polietilenoglicol e poli(ácido aspártico) (Silva *et al.*, 2006). Este fármaco, que também é utilizado no tratamento da tuberculose, apresenta como principal limitação a hepatotoxicidade. Assim, o objetivo neste estudo foi promover a liberação controlada do fármaco, diminuindo sua exposição ao organismo e, conseqüentemente, efeitos adversos relacionados. Como resultado verificou-se que 86% do fármaco foram incorporados aos grupos carboxilas da micela. Nos testes *in vitro* em culturas de *M. tuberculosis* Ra e Rv, a concentração inibitória mínima da micela foi de 0,475 µg/mL e 0,950 µg/mL, respectivamente. Estas concentrações foram menores que as obtidas para a pirazinamida isolada (6,25 e 12,5 µg/mL), indicando maior atividade do fármaco com o transportador.

O haloperidol é um antipsicótico que, após ingestão da dose convencional, é responsável por reações adversas associadas à elevada concentração do fármaco na corrente sanguínea. Além disso, apresenta como fator limitante a baixa solubilidade. Por estas razões, com a finalidade de superar tais problemas relacionados ao haloperidol, Hans e colaboradores (2007) promoveram a (1) ligação covalente do

haloperidol aos copolímeros metoxi polietilenoglicol e poli(ácido láctico) e avaliaram a liberação do fármaco comparando com a liberação do composto quando apenas (2) incorporado a micela, bem como com a liberação da (3) combinação do fármaco ligado e incorporado a micela. Este estudo indicou que a utilização do haloperidol com transportadores micelares mostra-se mais promissora do que a utilização do fármaco na forma livre (Hans *et al.*, 2007).

Infelizmente poucos pró-fármacos micelares são encontrados para o tratamento das doenças negligenciadas, a maioria destes são reportados como antineoplásicos. Neste caso, o uso da nanotecnologia no combate ao câncer tem sido crescente (Oerlemans *et al.*, 2010; Blanco *et al.*, 2011; Chindambaram *et al.*, 2011) . Embora medicamentos quimioterápicos tenham levado a melhorias na sobrevivência do pacientes com câncer, barreiras biológicas, tais como sistema reticuloendotelial, metabolização hepática e excreção impedem a distribuição destes fármacos fazendo com que apenas uma pequena parte alcance as células tumorais. Característica muito importante da utilização de nanotransportadores é o acúmulo em regiões tumorais devido ao efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) (Blanco *et al.*, 2011).

A camptotecina é um alcalóide antitumoral inibidor da enzima topoisomerase I, a qual está presente em grande quantidade nas células neoplásicas. Esta molécula apresenta-se na forma lactônica ativa e na forma carboxilato inativa, quando em pH neutro. Esta última liga-se preferencialmente à albumina sérica, modificando o equilíbrio da reação na direção da formação do composto não ativo. Outro fator limitante para o uso da camptotecina é a baixa solubilidade em meio aquoso e toxicidade, provocada principalmente pela eliminação da forma carboxilato pelos rins, causando cistite hemorrágica. Fan e colaboradores (2010) esterificaram o grupo hidroxila deste composto ao copolímero poli- $[\alpha,\beta\text{-(N-carboxibutil)}\text{-1-aspartamida}]$, com o objetivo de aumentar a solubilidade do fármaco. As micelas obtidas apresentaram maior período de retenção e tempo de ação superior ao do princípio ativo, quando ligado covalentemente à micela, aumentando a eficácia e diminuindo a toxicidade. Outro composto antineoplásico, paclitaxel, é um forte inibidor da angiogênese, capaz de impedir a proliferação de células endoteliais vasculares em concentrações picomolares. No entanto, dificuldades na solubilidade do composto limitam sua utilização. Com o objetivo

de superar este problema, Alani e colaboradores (2010) propuseram a síntese de pró-fármacos formadores de micela do paclitaxel, os quais pudessem liberar o princípio ativo de maneira pH-dependente, aumentar a permeabilidade e retenção em células tumorais, promovendo maior distribuição do princípio ativo em células tumorais. Utilizou-se como polímero o poli(etilenoglicol aspartato), o qual foi ligado covalentemente ao paclitaxel através dos espaçantes ácido levulínico e ácido benzóico. Os dois tipos de micelas foram capazes de aumentar a solubilidade do paclitaxel, no entanto, apenas aquele com espaçante ácido levulínico foi capaz de promover a liberação do composto de maneira pH-dependente.

As antraciclinas são fármacos utilizados no tratamento do câncer de pulmão. Esta classe apresenta como principal limitação a cardiotoxicidade. Recentemente, Harada e colaboradores (2011) investigaram a ligação covalente da epirrubicina ao polímero poli(etilenoglicol-aspartato). Esta ligação foi realizada por grupo hidrazona, que é lábil em meio ácido. Os estudos farmacocinéticos em ratos indicaram que a epirrubicina-poli(etilenoglicol-aspartato) apresentou maior retenção plasmática que o fármaco livre. Os resultados mostraram que este pró-fármaco foi capaz de promover liberação eficiente do fármaco no local de ação, havendo possibilidade de diminuir o efeito cardiotóxico.

1.6 MODELAGEM MOLECULAR

O processo de planejamento racional para obtenção de novos fármacos tem-se mostrado como um dos mais promissores, uma vez que considera aspectos morfológicos ou bioquímicos do sistema biológico ou doença em questão, conduzindo, assim, à descoberta *de novo* e, pressupostamente, de melhores fármacos (Barreiro *et al.*, 1997).

A Modelagem Molecular (MM) apresenta-se nos dias atuais como uma das ferramentas mais amplamente utilizadas no processo de descoberta de novos fármacos (Singh *et al.*, 2006; Ekins *et al.*, 2007). É definida pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) como “a investigação das estruturas e das propriedades moleculares, através do uso da química computacional e técnicas de visualização

gráfica, visando fornecer representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias” (Sant’Anna, 2002). Assim, através da MM é possível construir modelos químicos e/ou biológicos, os quais, submetidos a programas computacionais específicos, permitem visualizar, simular e interpretar sistemas inter-relacionados, como os envolvidos na interação fármaco-receptor/sítio ativo (Henckel, Billings, 1995).

Na década de 1980, o desenvolvimento e barateamento de novos programas e computadores (Loewe, 2002), associados aos avanços do conhecimento bioquímico sobre as bases moleculares das doenças (Ekins *et al.*, 2007), permitiram, à MM, avanço significativo, que proporcionou contribuição na descoberta de novos fármacos. Desta forma, o planejamento racional auxiliado por MM tem se mostrado como nova abordagem na descoberta de compostos, promovendo avanços em pesquisas e despertando interesse tanto no meio acadêmico quanto em indústrias farmacêuticas (Henkel, Billings, 1995; Gund *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 2006).

Atualmente, esta ferramenta é utilizada para entender redes bioquímicas e fisiológicas bem como os processos patológicos envolvidos nas doenças (Orloff, Stanski, 2011). Pode ser usada, também, na previsão de características farmacocinéticas e toxicológicas relevantes de compostos ativos (Chen *et al.*, 2011; Crivori *et al.*, 2011; Taboureau, Jorgensen, 2011; Talevi *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011). Além disso, técnicas de MM estão sendo empregadas no planejamento de bioligantes em etapas finais de procedimentos da pesquisa genômica, em busca do que poderá vir a ser a terapia do terceiro milênio (Dahl, Sylte, 2005).

Dentre as técnicas computacionais, a dinâmica molecular apresenta-se como uma das técnicas mais versáteis para o estudo de macromoléculas biológicas. Esta metodologia é fundamentada nos princípios da mecânica clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo e dos átomos individuais que compõem o sistema. Tendo como base a mecânica clássica, as moléculas são tratadas como coleção de átomos, que pode ser descrita por forças newtonianas (partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas). O conjunto completo dos potenciais de interação entre os átomos é denominado de campo de força. Este permite o cálculo da energia potencial do sistema, a partir de uma estrutura tridimensional, a qual é descrita pela soma das energias envolvidas na ligação

entre átomos (comprimentos, ângulos de ligação e ângulos diedros) e entre átomos não ligados (interações de van der Waals e de Coulomb) (Namba *et al.*, 2008).

A aplicação da MM em Química Farmacêutica pode ser realizada de forma indireta ou direta. A abordagem indireta se dá quando a estrutura do alvo biológico não está disponível e é realizada através da tentativa de se obter parâmetros eletrônicos e estéricos com o objetivo de elucidar a relação estrutura química-atividade biológica. A abordagem direta é realizada quando se conhece a estrutura tridimensional do alvo biológico (receptor ou enzima). O alvo isolado é caracterizado, por exemplo, por cristalografia de raios-X, possibilitando a visualização tridimensional de sua estrutura e, a partir desta, a construção de modelos estruturais específicos, denominados ligantes (Henkel, Billings, 1995; Ekins *et al.*, 2007).

2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Face à necessidade de quimioterápicos potencialmente úteis e menos tóxicos contra doença de Chagas e leishmanioses, especialmente devido ao crescente número de casos de resistência, alta incidência de efeitos adversos e, em alguns casos, baixa eficácia, é imprescindível a busca de novas alternativas quimioterápicas para ambas as parasitoses.

Com base na latenciação de fármacos, como processo útil de modificação molecular (Chung *et al.*, 2005), e na utilidade de micelas como formas de transporte interessantes de fármacos ou compostos bioativos (Torchilin, 2001; Rangel-Yagui *et al.*, 2005), este trabalho teve como objetivo o estudo da síntese de pró-fármacos formadores de micelas poliméricas dirigidas, ligadas aos compostos hidroximetilnitrofural (Figura 4) e helenalina (Figura 11). Pretende-se, assim, promover a liberação controlada e consequente diminuição da toxicidade destes compostos, bem como melhorar suas características físico-químicas.

Tanto no caso da doença de Chagas quanto para as leishmanioses a ação destes compostos será dirigida para os macrófagos, no interior dos quais se encontram os parasitos, através da ligação do grupo tiomanosídio como grupo diretor das micelas, obtendo-se fármacos dirigidos micelares. Uma vez internalizados, os compostos

bioativos serão liberados das matrizes poliméricas correspondentes, podendo entrar diretamente nos parasitos.

Estudo complementar por modelagem molecular foi realizado para os fármacos dirigidos micelares formados pelo tiomanosídeo - ácido anacárdico – composto ativo para obter informações sobre hidrólise e liberação dos compostos ativos

Dois tipos de micelas foram estudadas:

(A) Tiomanose + dextrano + polipropilenoglicol + composto bioativo (NFOH ou helenalina)

Neste, o dextrano e o polipropilenoglicol conferem hidrofiliabilidade e hidrofobicidade, respectivamente, ao copolímero.

(B) Tiomanosídeo + ácido anacárdico reduzido + composto bioativo (NFOH ou helenalina)

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1 Reagentes e solventes

- ❖ Acetona anidra
- ❖ Ácido bromídrico
- ❖ Ácido monocloroacético
- ❖ Ácido *p*-toluenossulfônico
- ❖ Bicarbonato de sódio
- ❖ Carbonato de potássio
- ❖ Cloroacetona
- ❖ Cloreto de sódio
- ❖ Clorofórmio
- ❖ Diclorometano
- ❖ Dicicloexilcarbodiimida (DCC)
- ❖ 1,2-Dicloroetano
- ❖ 4-Dimetilaminopiridina (DMAP)
- ❖ Etanol
- ❖ 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)
- ❖ Etilenodiamina
- ❖ Metanol
- ❖ 1-Heptanol
- ❖ Hexano
- ❖ Hidróxido de sódio
- ❖ α -D-Pentacetato de manose
- ❖ Polipropilenoglicol 1000
- ❖ Tetraidrofurano (THF)
- ❖ Tiouréia
- ❖ Tolueno
- ❖ Sulfato de sódio

3.1.2 Equipamentos

- ❖ Agitadores magnéticos;
- ❖ Rotaevaporador Büchi;
- ❖ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advanced DPX-300;
- ❖ Liofilizador Christ Alpha 1-2.

3.1.3 Softwares para estudo de modelagem molecular

- ❖ HyperChem 7.51 (HyperChem Program Release 7 for Windows);
- ❖ MOLSIM 3.2. (Doherty, 1997);
- ❖ Gaussian G03 (*Gaussian 03W for Windows*, version 6).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Síntese

3.2.1.1 Síntese do hidroximetilnitrofural (NFOH) (Trossini *et al.*, 2009)

A síntese do derivado hidroximetilnitrofural foi realizada em meio alcalino, com carbonato de potássio na proporção de 1:1 e excesso de formaldeído em meio aquoso. Este último foi adicionado em duas etapas: metade no início da reação e outra metade no momento em que se observa por CCD (clorofórmio/metanol/ácido acético 85:5:5) a formação do derivado planejado, ou seja, 3,5 horas. Manteve-se o sistema sob agitação e proteção da luz por 7 horas. Em seguida, o produto foi lavado com metanol e recristalizado de metanol/água (6:0,1, v/v).

Rendimento: 67%; RMN ^1H : 300 MHz, δ ppm – 2,50 (DMSO), 3,29 (H_2O), 4,61 (t, 2H_2 , $J = 6$ Hz); 5,46 (t, 1H_{OH} , $J = 6$ Hz); 7,24 (d, 1H_8 , $J = 3$ Hz); 7,58 (t, 1H_3 , $J = 6$ Hz); 7,78 (s, 1H_6); 7,81 (d, 1H_9 , $J = 3$ Hz); 10,97 (s, 1H_5). RMN ^{13}C : 75 MHz, δ ppm – 39,32 (DMSO), 154,33 (NHCONH), 152,61 (C_{10}), 151,13 (C_7), 127,70 (C_6), 114,98 (C_8), 112,52 (C_9), 62,97 (C_2).

3.2.1.2 Síntese do tiomanosídeo

ESQUEMA GERAL

3.2.1.2.1 *Pentacetato de manose* MÉTODO A (Boger *et al.*, 1995)

Em balão de fundo redondo adicionaram-se *D*-manose (0,72 mmol), 5 mL de **piridina** e 0,81 mL (8,63 mmol) de **anidrido acético**. Manteve-se a mistura sob agitação por 24 h. Após este período, verteu-se o meio reacional em 40 mL de solução de acetato de etila:água (1:1) e transferiu-se para um funil de separação. Realizou-se lavagem com 20 mL de solução de HCl 10%, 20 mL de água, 20 mL de solução de bicarbonato de sódio saturado, 20 mL de água e 20 mL de solução de cloreto de sódio saturado. A fase orgânica foi separada, adicionou-se sulfato de sódio anidro e manteve-se a solução sob agitação por 30 minutos. Ao final, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida.

MÉTODO B

Em balão de fundo redondo, adicionaram-se 9 g (50 mmol) de *D*-manose em 90 mL de **anidrido acético**. Em seguida, acrescentaram-se 2 mmol (450 mg) de **iodo**. A reação foi mantida sob agitação por 3 h à temperatura ambiente. A solução foi, então, diluída em 300 mL de diclorometano e transferida para o funil de separação. Procedeu-se à lavagem com solução de tiosulfato de sódio 5%, água gelada (duas vezes, entre as extrações), solução saturada de bicarbonato de sódio e solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi separada, adicionou-se sulfato de sódio anidro e manteve-se a solução sob agitação por 30 minutos. Ao final, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Tentativa de cristalização do produto foi realizada com etanol.

Rendimento: 76%. RMN ^1H : 300 MHz, δ ppm - 6,06 (d, 1H_1), 5,35 (t, 1H_2), 5,32 (t, 1H_3), 5,27-5,24 (m, 1H_4), 4,11-4,07 (m, 1H_5), 4,29-4,23 (m, 2H_6), 2,21-1,99 (s, 15H_{12-16}). RMN ^{13}C : 75 MHz, δ ppm - 90,27 e 90,41 ($\text{C}_{1\alpha\beta}$), 77,69-61,91 (5C_{2-6}), 170,30-167,86 (5C_{7-11}), 20,54-20,32 (5C_{12-16}).

3.2.1.2.2 *Pentabenzoato de manose* (Ness *et al.*, 1950; Carvalho *et al.*, 2003)

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 5 g de *D*-manose (28 mmol) em 60 mL de **piridina anidra** e esta solução foi mantida em refluxo por 30 min. Em seguida, acrescentaram-se 20 mL de **cloreto de benzoíla** a frio e a temperatura da reação foi ajustada para 60 °C. A mistura foi mantida sob agitação durante 60 minutos. Em seguida, adicionaram-se 2,5 mL de água gelada, após 10 minutos adicionaram-se 25 mL de água gelada e, logo em seguida, adicionaram-se mais 300 mL de água gelada. A solução foi mantida em agitação por 40 minutos e filtrada. Para a cristalização, o produto foi mantido em 18 mL de metanol a frio por 12 horas.

Com a finalidade de retirar o excesso de piridina, solubilizou-se, novamente, o produto obtido em diclorometano e foi realizada lavagem da mistura com 100 mL de água e 100 mL de solução de sulfato de cobre a 10%. A fase orgânica foi separada, adicionou-se sulfato de sódio anidro e manteve-se a solução sob agitação por 30 minutos. Ao final, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Acrescentou-se, em seguida, metanol a frio.

Rendimento: 96%. RMN ^1H : 300 MHz, δ ppm - 6,45 (d, 1H_1), 6,15 (t, 1H_2), 5,83 (t, 1H_3), 6,21 (d, 1H_4), 4,55-4,37 (m, 1H_5), 4,79-4,58 (m, 2H_6), 8,17-7,24 (m, 25H_{12-36}).

3.2.1.2.3 **Brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosila** MÉTODO A

Em balão de fundo redondo, adicionaram-se 12 g (34 mmol) de pentacetato de manose em 10 mL de **ácido acético glacial**. A reação foi colocada em banho de gelo (temperatura a 0 °C) e após dissolução acrescentaram-se 10 mL de solução saturada de HBr em ácido acético. A solução foi mantida sob agitação por 4 h à temperatura ambiente. Após esse período a reação foi armazenada sob refrigeração por 10 h, diluída em diclorometano e vertida sobre água gelada. A fase aquosa separada foi extraída com diclorometano e as frações orgânicas reunidas foram lavadas com solução de bicarbonato de sódio 5% previamente resfriada em banho de gelo. Adicionou-se sulfato de sódio anidro e manteve-se a solução sob agitação por 30 minutos. Ao final, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida.

MÉTODO B

Em balão de fundo redondo, adicionaram-se 4 g de pentacetato de manose (11 mmol) e 16 mL de **1,2-dicloroetano**. Após a dissolução, acrescentaram-se 16 mL de solução saturada de HBr em ácido acético. Manteve-se a mistura sob agitação por 3 h, à temperatura ambiente, e, em seguida a solução foi diluída com diclorometano e transferida para um funil de separação. A mistura foi lavada com água gelada (duas vezes), uma vez com solução saturada de bicarbonato de sódio e novamente com água. A fase orgânica foi separada e adicionou-se sulfato de sódio anidro e manteve-se a solução sob agitação por 30 minutos. Ao final, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida. (Ness *et al.*, 1950; Carvalho *et al.*, 2003).

A mesma reação foi realizada também substituindo o solvente **1,2-dicloroetano** por **clorofórmio** ou **diclorometano**. Nesse caso, adição de solução saturada de HBr

em ácido acético à solução foi realizada mantendo-se o balão em banho de gelo (temperatura a 0 °C) por 1 h, sob agitação (Mitchell *et al.*, 2001).

Rendimento: 84%. RMN ¹H: 300 MHz, δ ppm – 6,31 (d, 1H₁), 5,73-5,68 (m, 1H₂), 5,45-5,40 (m, 1H₃), 5,34 (d, 1H₄), 4,16-4,11 (m, 1H₅), 4,36-4,19 (m, 2H₆), 2,18-2,00 (s, 12H₁₁₋₁₄). RMN ¹³C: 75 MHz, δ ppm - 91,87 (C₁), 83,95-61,26 (5C₂₋₆), 170,64-169,38 (4C₇₋₁₀), 20,50-20,32 (4C₁₁₋₁₄).

3.2.1.2.4 Brometo de 2,3,4,6- tetra-O-benzoil-α-D-manopiranosila

Em balão de fundo redondo, adicionaram-se 4 g (6 mmol) de pentabenzoato de manose em 8 mL de 1,2-dicloroetano. A solução obtida foi colocada em banho de gelo (temperatura a 0 °C) e acrescentaram-se 8 mL de solução saturada de HBr em ácido acético. A solução foi mantida sob agitação por 2 h à temperatura ambiente. Acrescentaram-se 40 mL de tolueno à reação e, em seguida, a fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida. Repetiu-se a o procedimento de extração com tolueno e, por último, acrescentaram-se 50 mL de éter mais 75 mL de pentano a frio para tentativa de cristalização (Ness *et al.*, 1950).

Rendimento: 92%. RMN ¹H: 300 MHz, δ ppm - 6,58 (d, 1H₁), 6,13 (t, 1H₂), 5,83 (d, 1H₃), 6,20-6,00 (m, 1H₄), 4,55-4,37 (m, 1H₅), 4,79-4,58 (2H₆), 8,15-7,38 (m, 20C₁₂₋₃₄).

3.2.1.2.5 **Bromidrato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-1-pseudotiouréia** **MÉTODO A**

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 10 mL de acetona anidra, 0,46 g de **tiouréia (6 mmol)** e 2 g (5 mmol) de brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosila. Manteve-se a reação sob agitação e refluxo por **90 minutos**. Após resfriamento, o solvente foi removido sob pressão reduzida (Chipowsky *et al.*, 1973; Carvalho *et al.*, 2003).

A mesma reação foi realizada também por período maior, **2 e 3 horas**, e com maior quantidade do reagente **tiouréia (0,77 g, 10 mmol)**.

MÉTODO B

Adicionaram-se 5,1 g (14 mmol) de brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosila, 1,4 g de tiuréia (18 mmol) e 20 mL de **2-propanol**. A reação foi mantida sob agitação e em refluxo por 45 min. A mistura foi diluída em hexano, resfriada e, após a obtenção de cristais, filtrada (Bonner *et al.*, 1951).

MÉTODO C

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 10 mL de acetona anidra, 0,25 g de **tiouréia (3 mmol)** e 1,35 g (3,65 mmol) de brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosila. Manteve-se a mistura sob agitação e refluxo por **4-5 horas**. Após resfriamento, parte do solvente foi removida sob pressão reduzida. Em seguida, algumas gotas de clorofórmio foram adicionadas ao balão para promover a precipitação do excesso de tiouréia (Davis *et al.*, 2006).

Rendimento: 54%. RMN ^1H : 300 MHz, δ ppm - 5,72 (s, 1H_1), 5,22 (d, 1H_2), 5,15 (d, 1H_3), 5,09-5,01 (m, 1H_4), 4,09-4,00 (m, 1H_5), 4,13 (t, 2H_6), 2,15-1,91 (s, 12C_{14-17}), 8,30 (s, 1H_{NH}). RMN ^{13}C : 75 MHz, δ ppm, 79,12 (1C_1), 71,26-62,39 (5C_{2-6}), 30,58 (1C_7), 171,93-169,38 (4C_{10-13}).

3.2.1.2.6 **Bromidrato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-1-pseudotiouréia** (Chipowsky *et al.*, 1973; Carvalho *et al.*, 2003).

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 10 mL de acetona anidra, 0,46 g de tiouréia (6 mmol) e 3 g (4,5 mmol) de brometo de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-D-manopiranosila. Manteve-se a mistura sob agitação e refluxo por **5 horas**. Após resfriamento, parte do solvente foi removida sob pressão reduzida e o balão foi mantido em banho de gelo para precipitação do produto. Sucessivas tentativas de precipitação foram realizadas com acetona e 2-propanol.

A mesma reação foi realizada também por período de tempo maior, **2 e 3 horas**.

Rendimento: 90%. RMN ^1H : 300 MHz, δ ppm - 6,19 (s, 1H_1), 5,70 (d, 1H_2), 5,39 (d, 1H_3), 5,90 (dd, 1H_4), 4,52 (d, 1H_5), 4,65 (d, 2H_6), 8,06-7,31 (m, 20C_{14-32}).

3.2.1.2.7 *Tetra-O-acetil-1-tio- α -D-manopiranosídeo de cianometila*

Solubilizou-se 40 mmol de bromidrato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-1- pseudotiouréia em solução de água e acetona (1:1, v/v), sob agitação. A esta solução adicionaram-se 15 g (200 mmol) de cloroacetonitrila e, em seguida, 8 g (56 mmol) de carbonato de potássio e 10 g (100 mmol) de bissulfito de sódio. Manteve-se a agitação por 1 hora e verteu-se a mistura em água gelada. Manteve-se a reação sob intensa agitação por **8 horas**, após o que foi adicionada nova porção de água gelada (Lee *et al.*, 1976; Carvalho *et al.*, 2003). O produto foi extraído com sucessivas lavagens de diclorometano e, por último, solução saturada de cloreto de sódio. Adicionou-se sulfato de sódio anidro e manteve-se a solução sob agitação por 30 minutos. Ao final, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida.

A mesma reação foi realizada também por período de tempo menor, **6 horas**, acompanhada por CCD.

Rendimento: 52%, 6h. RMN ^1H : 300 MHz, δ ppm - 5,46 (d, 1H₁), 5,40 (d, 1H₂), 5,37-5,35 (m, 1H₃), 5,33-5,23 (m, 1H₄), 4,24-4,15 (m, 1H₅), 4,33-4,25 (m, 2H₆), 2,21-2,00 (s, 12C₁₃₋₁₆) 3,40 (dd, 2H₇). RMN ^{13}C : 75 MHz, δ ppm - 92,11 e 92,90 (C_{1 α β}), 77,57-62,67 (5C₂₋₆), 114,6 (1C₈), 170,98-169,93 (4C₉₋₁₂), 20,91-19,98 (C₁₃₋₁₆).

3.2.1.2.8 *Tetra-O-benzoil-1-tio- α -D-manopiranosídeo de cianometila*

Solubilizaram-se 13 g (20 mmol) de bromidrato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-*D*-manopiranosil-1-pseudotiouréia em solução de água e acetona (1:1, v/v), sob agitação. A esta solução adicionaram-se 15 g (200 mmol) de cloroacetona e, em seguida, 8 g (56 mmol) de carbonato de potássio e 10 g (100 mmol) de bissulfito de sódio. Manteve-se a agitação por 1 h e verteu-se a mistura em água gelada. Manteve-se a reação sob intensa agitação por 5 h em banho de gelo, adicionando-se, em seguida, nova porção de água gelada (Lee *et al.*, 1976; Carvalho *et al.*, 2003). A reação foi mantida mais 2 h sob agitação em banho de gelo para formação de precipitado.

Rendimento: 93%. RMN ^1H : 300 MHz, δ ppm - 6,17 (s, 1H₁), 5,74 (d, 1H₂), 5,52 (d, 1H₃), 6,13 (d, 1H₄), 4,43 (d, 1H₅), 4,78-4,65 (m, 2H₆), 8,11-7,23 (m, 20H₈₋₃₀), 3,68-3,57 (m, CH₂S).

3.2.1.2.9 **1-Tio- α -D-manopiranosídeo de 2-imino-2-metoxietila** (Lee *et al.*, 1976; Carvalho *et al.*, 2003)

MÉTODO A

Manteve-se a solução de metóxido de sódio 0,01 M e 0,28 mmol de **2,3,4,6-tetra-O-benzoyl-1-tio-D-manopiranosídeo-cianometil** em metanol anidro, sob agitação por 6 h à temperatura ambiente. Em seguida, após evaporação do solvente, o produto foi concentrado sob pressão reduzida.

MÉTODO B

Solubilizou-se 0,1 g (0,37 mmol) do **2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- α -D-manopiranosídeo-cianometil** em 0,01 M de metóxido de sódio. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24-48 h e, em seguida, neutralizada com resina de troca iônica. Adicionou-se sulfato de sódio anidro e manteve-se a solução sob

agitação por 30 minutos. Ao final, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida (Lee *et al.*, 1976; Carvalho *et al.*, 2003).

Rendimento: 60%. RMN ^1H : 300 MHz, δ ppm - 4,87 (d, 1H₁), 3,77 (d, 1H₂), 3,67 (d, 1H₃), 3,61 (d, 1H₄), 3,48 (m, 1H₅), 3,58-3,54 (m, 2H₆), 8,44 (s, NH), 3,42 (d, 2H₇), 3,17 (s, 3H₁₀).

As condições de síntese do tiomanosídeo e de seus intermediários encontram-se resumidos na Tabela I.

Tabela I: Condições de síntese do tiomanosídeo e de seus intermediários

REAÇÃO	PROPORÇÃO MOLAR	SOLVENTE	TEMPO	REFERÊNCIA
Pentacetato de manose	Método A: 0,72 mmol de <i>D</i> -manose e 8,63 mmol de anidrido acético.	piridina	24 h	Boger <i>et al.</i> , 1995
	Método B: 50 mmol de <i>D</i> -manose; 90 mL de anidrido acético; 2 mmol de iodo.	anidrido acético	3 h	
Pentabenzoato de manose	28 mmol de <i>D</i> -manose; 60 mL de piridina anidra e 20 mL de cloreto de benzoíla.	piridina	2 h e 10 min	Ness <i>et al.</i> , 1950; Carvalho <i>et al.</i> , 2003
Brometo de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α - <i>D</i> -manopiranosila	Método A: 34 mmol de pentacetato de manose, 10 mL de ácido acético glacial e 10 mL de solução saturada de HBr em ácido acético.	ácido acético glacial	4 h	Ness <i>et al.</i> , 1950; Carvalho <i>et al.</i> , 2003
	Método B: 11 mmol de pentacetato de manose, 16 mL de 1,2-dicloroetano e 16 mL de solução saturada de HBr em ácido acético.	1,2-dicloroetano ou diclorometano ou clorofórmio	3 h	
Brometo de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoil- α - <i>D</i> -manopiranosila	6 mmol de pentabenzoato de manose, 8 mL de 1,2-dicloroetano e 8 mL de solução saturada de HBr em ácido acético.	1,2-dicloroetano	2 h	Ness <i>et al.</i> , 1950

Tabela I: Condições de síntese do tiomanosídio e de seus intermediários (continuação)

REAÇÃO	PROPORÇÃO MOLAR	SOLVENTE	TEMPO	REFERÊNCIA
Bromidrato de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α - <i>D</i> -manopiranosil-1-pseudotiouréia	Método A: 5 mmol de brometo de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α - <i>D</i> -manopiranosila, 6 mmol de tiouréia e 10 mL de acetona anidra.	acetona	90 min	Chipowsky <i>et al.</i> , 1973; Carvalho <i>et al.</i> , 2003
	10 mmol de tiouréia	acetona	2-3 h	Chipowsky <i>et al.</i> , 1973; Carvalho <i>et al.</i> , 2003
	Método B: 14 mmol de brometo de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α - <i>D</i> -manopiranosila, 18 mmol de tiouréia e 20 mL de 2-propanol. Método C: 3,65 mmol de brometo de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α - <i>D</i> -manopiranosila, 3 mmol de tiouréia e 10 mL de acetona anidra.	2-propanol	45 min	Bonner <i>et al.</i> , 1951
Bromidrato de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoil- α - <i>D</i> -manopiranosil-1-pseudotiouréia	4,5 mmol de brometo de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoil- <i>D</i> -manopiranosila, 6 mmol de tiouréia e 10 mL de acetona anidra.	acetona	90 min	Chipowsky <i>et al.</i> , 1973; Carvalho <i>et al.</i> , 2003
			2 h 3 h	
Tetra- <i>O</i> -acetil-1-tio- α - <i>D</i> -manopiranosídio de cianometila	40mmol de bromidrato de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- α - <i>D</i> -manopiranosil-1-pseudotiouréia, 200 mmol de cloroacetoneitrila, 56 mmol de carbonato de potássio e 100 mmol de bissulfito de sódio.	água e acetona (1:1, v/v)	9 h 5 h	Lee <i>et al.</i> , 1976; Carvalho <i>et al.</i> , 2003
Tetra- <i>O</i> -benzoil-1-tio- α - <i>D</i> -manopiranosídio de cianometila	20 mmol de bromidrato de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoil- <i>D</i> -manopiranosil-1-pseudotiouréia, 200 mmol de cloroacetoneitrila, 56 mmol de carbonato de potássio e 100 mmol de bissulfito de sódio.	água e acetona (1:1, v/v)	6 h	Lee <i>et al.</i> , 1976; Carvalho <i>et al.</i> , 2003
1-Tio- α - <i>D</i> -manopiranosídio de 2-imino-2-metoxietila	Método A: solução de metóxido de sódio 0,01 M e 0,28 mmol de 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -benzoil-1-tio- <i>D</i> -manopiranosídio-cianometil	metanol	6 h	Lee <i>et al.</i> , 1976; Carvalho <i>et al.</i> , 2003
	Método B: solução de metóxido de sódio 0,01 M e 0,37 mmol do 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil-1-tio- α - <i>D</i> -manopiranosídio-cianometil	metanol	24–48 h	Lee <i>et al.</i> , 1976; Carvalho <i>et al.</i> , 2003

3.2.1.3 Síntese do intermediário carboximetildextrano*

* A representação dos grupos substituintes dos produtos esquematizados neste item (3.2.1.3) é aleatória.

MÉTODO A (Nishikawa *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 2003)

Adicionou-se 1 g (0,0014 mmol) de dextrano T-70 e 10 mL de hidróxido de sódio 6 M, em balão de fundo redondo. A mistura foi aquecida até 70 °C e, após a dissolução, adicionaram-se 2 g (21 mmol) de ácido monocloroacético, mantendo-se sob agitação a 70 °C por 1 hora. A mistura foi dializada em membrana de diálise com valor de *cut off* de 12.000 a 14.000 Da, contra água destilada, por 72 h e, em seguida, liofilizada.

MÉTODO B (Wagner *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2007)

Em balão de fundo redondo, adicionou-se 1 g de dextrano T-70 à mistura de isopropanol (22 mL) e solução de hidróxido de sódio 14,3 M (4 mL) mantendo-a sob agitação em temperatura ambiente durante 1 h. Em seguida, adicionaram-se 1,46 g (0,15 mmol) de ácido monocloroacético, mantendo-se a agitação por 90 min a 60 °C. O isopropanol foi, então, removido e adicionaram-se 10 mL de metanol sob agitação por 15 min. Em seguida, o metanol foi removido, acrescentaram-se 20 mL de água destilada e ajustou-se o pH para 2-3 com solução de HCl 1 M, a fim de converter COONa em COOH . Por último, a solução foi dializada contra água destilada em membrana de diálise com valor de *cut off* de 12.000 a 14.000 D, por 72 h e liofilizada.

MÉTODO C (Bouttemy, 1960; Carvalho *et al.*, 2003)

Em balão de fundo redondo, adicionaram-se 10 g (0,014 mmol) de dextrano T-70 e 100 mL de hidróxido de sódio 6 M, sendo a mistura aquecida a 70 °C. Após dissolução, adicionaram-se 20 g (212 mmol) de ácido monocloroacético em pequenas porções, mantendo-se agitação e temperatura a 70 °C por meia hora. Adicionaram-se 100 mL de hidróxido de sódio 11,5 M e, após o tempo necessário para a temperatura atingir novamente 70 °C, foram adicionados mais 20 g (212 mmol) de ácido monocloroacético em pequenas porções. Após 30 min, adicionaram-se 15 g de hidróxido de sódio em pequenas porções, até completa dissolução. Em seguida, juntou-se nova porção de 20 g (212 mmol) de ácido monocloroacético. Manteve-se a reação sob agitação e aquecimento por mais 1 h e, após resfriamento, a solução foi dializada contra água destilada em membrana de diálise com valor de *cut off* de 12.000 a 14.000 Da, por 72 h, e liofilizada.

3.2.1.4 Síntese do intermediário carboximetildextrano-etilenodiamina (Sheehan *et al.*, 1955; Rebizak *et al.*, 1997; Carvalho *et al.*, 2003)*

* A representação dos grupos substituintes dos produtos esquematizados neste item (3.2.1.4) é aleatória.

Adicionaram-se 10 mL de água destilada a 1 g de carboximetildextrano T-70 (3,77 mmol de COOH) e ácido clorídrico até pH 5,0. Em seguida, adicionou-se DCC (6,5 mmol) previamente dissolvida em 3 mL de THF e 0,25 g de etilenodiamina. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 15 h. Em seguida,

realizou-se a diálise em membrana, *cut off* de 12.000 a 14.000 Da, contra água destilada, por 72 h e por último liofilizou-se.

3.2.1.5 Síntese do intermediário carboximetildextrano-manose*

* A representação dos grupos substituintes dos produtos esquematizados neste item (3.2.1.5) é aleatória.

Dificuldades quanto à obtenção de quantidade suficiente de tiomanosídeo puro para ligar ao polímero carboximetildextrano levaram à esterificação da manose não modificada.

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 3,5 mmol de carboximetildextrano, 3,85 mmol de EDC e 2,8 mmol de DMAP. Após 1 hora sob agitação em banho de gelo acrescentaram-se 2,8 mmol de manose. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A mistura foi dializada em membrana de diálise com valor de *cut off* de 12.000 a 14.000 Da, contra água destilada, por 72 h e, em seguida, liofilizada.

3.2.1.6 Síntese do intermediário carboximetildextrano – manose – mexicanina*

* A representação dos grupos substituintes dos produtos esquematizados neste item (3.2.1.6) é aleatória.

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 0,12 mmol de carboximetildextrano-manose, 0,13 mmol de EDC ou DCC e 0,1 mmol de DMAP. Após 1 hora sob agitação em banho de gelo acrescentou-se 0,1 mmol de mexicanina. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A mistura foi dializada em membrana de diálise com valor de *cut off* de 12.000 a 14.000 Da, contra água destilada, por 72 h, e, em seguida, liofilizada.

A mesma reação foi realizada com mexicanina em excesso (**0,5 mmol**) ou substituindo-se a água por DMSO.

3.2.1.7 Síntese do intermediário carboximetildextrano–manose-polipropilenoglicol*

* A representação dos grupos substituintes dos produtos esquematizados neste item (3.2.1.7) é aleatória.

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 0,12 mmol de carboximetildextrano-manose, 0,13 mmol de EDC ou DCC e 0,1 mmol de DMAP. Após 1 hora sob agitação em banho de gelo acrescentou-se 0,5 mmol de polipropilenoglicol. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A mistura foi dializada em membrana de diálise com valor de *cut off* de 12.000 a 14.000 Da, contra água destilada, por 72 h e, em seguida, liofilizada.

3.2.1.8 Hidrogenação do ácido anacárdico

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 1,15 mmol de ácido anacárdico e 0,15 mmol de Pd/C (10%) em metanol. A reação foi mantida sob agitação com balão de H₂ à temperatura ambiente, por 5 horas. Ao final, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida (Ghizzoni *et al.*, 2010). A mesma reação foi realizada também em etanol.

Rendimento: 81%. RMN ¹H: 300 MHz, δ ppm - 1,52-0,78 (m, 14H₈₋₂₁), 2,89 (t, 2H₇), 7,26 (m, 1H₄), 6,77 (m, 1H₅), 6,68 (m, 1H₃).

3.2.1.9 Síntese do intermediário heptanoato do ácido anarcárdico reduzido

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 0,15 mmol do ácido anacárdico reduzido, 0,18 mmol de ácido *p*-toluenossulfônico e 0,80 mmol de 1-heptanol em tolueno. A reação foi mantida em refluxo por 8 h e, ao final, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida (Braun *et al.*, 1991).

RMN ¹H: 300 MHz, δ ppm - 1,55-0,85 (m, 14H₈₋₂₁), 2,89 (t, 2H₇), 4,42 (t, 2H₂₂), 4,14-4,07 (m, 2H₂₃), 7,80-6,72 (m, 3H₃₋₅).

3.2.1.10 Síntese do intermediário etanoato do ácido anarcárdico reduzido

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 0,15 mmol do ácido anarcárdico reduzido e 0,18 mmol de ácido *p*-toluenossulfônico em etanol. A reação foi mantida em refluxo por 8 h e procedeu-se à extração com 100 mL de água (3 vezes, entre as extrações), 100 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio e 100 mL de solução de cloreto de sódio. Ao final, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida (Braun *et al.*, 1991).

Rendimento: 69%. RMN ^1H : 300 MHz, δ ppm - 1,54-0,87 (m, 14H₈₋₂₁), 2,91 (t, 2H₇), 4,14-4,07 (m, 2H₂₂), 3,72-3,69 (m, 3H₂₃), 4,44-4,37 (m, 1H₂₄), 7,67-6,69 (m, 3H₃₋₅).

3.2.1.11 Síntese do intermediário éster etílico do ácido anarcárdico—ácido monocloroacético

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 8,76 mmol de ácido anarcárdico (item 3.2.1.4.3), 26,29 mmol de carbonato de potássio e 10,51 mmol de ácido monocloroacético em acetona. A reação foi mantida sob agitação por 24 h. A solução foi, então, diluída em 100 mL de acetado de etila e transferida para o funil de separação. Procedeu-se à lavagem com 100 mL de água (3 vezes) e 100 mL de

solução saturada de cloreto de sódio. Adicionou-se sulfato de sódio anidro e manteve-se a solução sob agitação por 30 minutos. Ao final, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado sob pressão reduzida (Lee *et al.*, 2007).

Rendimento: 73%. RMN ^1H : 300 MHz, δ ppm - 1,67-0,85 (m, 14H₈₋₂₁), 2,89 (t, 2H₇), 4,14-4,07 (m, 2H₂₂), 3,72-3,69 (m, 3H₂₃), 4,44-4,37 (m, 1H₂₄), 7,30-6,69 (m, 3H₃₋₅), 11,19 (s, 1H₂₅).

3.2.2 Métodos de purificação

As técnicas de purificação utilizadas foram cromatografia em coluna e cromatografia preparativa. Para este fim, seis solventes isolados (acetato de etila, acetona, clorofórmio, hexano, metanol e tolueno) e doze combinações de solventes foram utilizadas para escolha da melhor fase móvel:

- ❖ Acetato de etila / hexano (1:1);
- ❖ Acetato de etila / hexano (1:2);
- ❖ Acetato de etila / hexano (2:1);
- ❖ Acetato de etila / tolueno (1:1);
- ❖ Acetato de etila / tolueno (1:2);
- ❖ Acetato de etila / tolueno (2:1);
- ❖ Acetona / hexano (1:1);
- ❖ Acetona / hexano (1:2);
- ❖ Acetona / hexano (2:1);
- ❖ Clorofórmio / metanol (1:1);
- ❖ Clorofórmio / metanol (1:2);
- ❖ Clorofórmio / metanol (2:1);

3.2.2.1 Cromatografia em coluna

A purificação do intermediário bromidrato 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil-*D*-manopiranosil-1-tiopseudouréia (3.2.1.2.6), tiomanosídeo (3.2.1.2.9) e heptanoato do ácido anarcárdico

reduzido (3.2.1.9) por cromatografia em coluna foi realizada em sílica-gel mesh 70-230. Testes para obtenção da melhor fase móvel foram feitos previamente em cromatoplasmas de sílica-gel G-60 da Merck.

3.2.2.2 Cromatografia preparativa

A purificação do intermediário 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-*D*-manopiranosídiocianometil (3.2.1.2.7) por cromatografia preparativa foi realizada em placas de vidro contendo sílica-gel 60 GF da Merck. As placas foram deixadas em estufa (aproximadamente 110 °C) durante 3 horas e, após a aplicação da amostra, reveladas em câmara ultravioleta. Testes para obtenção da melhor fase móvel (acetato de etila: hexano 1:1) foram feitos previamente em cromatoplasmas de sílica-gel G-60 da Merck.

3.2.3 Método analítico

3.2.3.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C

Esta análise espectrométrica foi efetuada em espectrômetro Bruker 300 MHz, modelo Advanced DPX-300, disponível na FCF-USP, com solventes deuterados adequados a cada caso.

3.2.3.2 Cromatografia em camada delgada

As reações foram acompanhadas com cromatoplasmas de sílica-gel G-60, Merck, para acompanhamento das reações, com as fases móveis apropriadas.

3.2.4 Análise quantitativa das carboxilas livres do carboximetildextrano

A determinação do número de carboxilas livres do carboximetildextrano foi realizada após funcionalização do polímero e antes da ligação de cada um dos substituintes, empregando-se titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 M.

Realizou-se, também, a análise por RMN ^1H , segundo trabalho de Caraschi e Filho (1990) e de Sun e colaboradores (2007). Utilizou-se 25 mg das amostras

solubilizadas em 600 μL de água deuterada. O cálculo do grau de substituição (GS) foi efetuado através da razão entre a integral dos hidrogênios metilênicos $\text{H}_8\text{-H}_9$ dos grupos carboximetila e as integrais dos hidrogênios $\text{H}_2\text{-H}_7$ pertencentes ao anel $\alpha\text{-D}$ -glicopiranosil do polímero dextrano.

3.2.5 Modelagem molecular

MÉTODO A₁

Inicialmente, as estruturas tridimensionais dos monômeros Mon1 (tiomanosídio-ácido anacárdico-hidroximetilnitrofural) e Mon2 (tiomanosídio-ácido anacárdico-elenalina) (Figura 14) nas formas neutras foram construídas no programa HyperChem 7.51. Utilizaram-se estruturas 3D do PDB (*Protein Data Base*), códigos 1YKI e 1JPC, como referência para o desenho do NFOH e tiomanosídio, respectivamente. A minimização de energia foi realizada por mecânica molecular (MM^+) nos programas HyperChem 7.51 e MOLSIM 3.2 (Doherty, 1997). Cargas atômicas parciais foram calculadas com o método semi-empírico AM1 (Dewar *et al.*, 1990) no programa HyperChem 7.51. Os modelos minimizados foram utilizados como estruturas iniciais para o desenvolvimento de simulações de dinâmica molecular (DM) e para a geração dos perfis de amostragem conformacional (PAC). Estudo preliminar de DM foi realizado para estabelecer o protocolo ideal para aplicação aos monômeros investigados, considerando o equilíbrio do sistema e valores de energia total (E_{TOTAL}). Os valores de desvio de posições atômicas (RMSd, *root-mean square deviation*) não foram utilizados como critério, já que as estruturas de referência correspondiam a partes de cada

unidade e não aos monômeros completos. Desenvolveram-se simulações de 100 ps (100.000 passos, cada passo 1 fs) a 300 K e massas fictícias (5.000 uma) foram atribuídas somente aos átomos do grupo diretor. Arquivos trajetória foram salvos a cada 20 passos (5.000 confôrmeros). O confôrmero de menor energia mínima foi selecionado, a partir do equilíbrio, e calcularam-se as contribuições de energia de ligação H e de solvatação (MOLSIM 3.2). Cargas de potencial eletrostático (ChelpG - *Electrostatic Potential Charges*) foram calculadas para o confôrmero de Mon1 (método *ab initio* HF/6-31G*, Gaussian G03).

Figura 14: Monômeros 1 e 2, formados pelos compostos bioativos hidroximetilnitrofurural e helenalina, respectivamente.

MÉTODO A₂

Aqueceu-se, lentamente, o sistema, antes de iniciar a dinâmica maior. Nesta metodologia, o confôrmero de menor energia mínima, após o equilíbrio, serviu de *input* para a próxima dinâmica. Desenvolveram-se dinâmicas de 20 ps a 50 K, 20 ps a 100 K, 20 ps a 200 K e a última maior de 500 ps a 300 K.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE

4.1.1 Síntese do hidroximetilnitrofural (NFOH)

A síntese do NFOH, realizada na presença de formaldeído e carbonato de potássio, proporcionou rendimento satisfatório, 67%, de produto amarelo característico. O produto foi caracterizado por RMN ^1H (Figura 15), verificando-se o aparecimento de sinais de acordo com a literatura (Trossini *et al.*, 2010).

Figura 15: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NFOH.

Observaram-se, então, tripleto a 5,46 ppm do grupo hidroxila (H1), tripleto a 4,61 ppm, correspondente aos H2, singleto a 10,97 ppm do H5, singleto a 7,78 ppm relacionado ao H6, tripleto a 7,58 ppm do H3, dubleto a 7,24 ppm correspondente ao H8 e dubleto a 7,81 ppm do H9.

A Figura 16 mostra o espectro de RMN ^{13}C do composto:

Figura 16: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do NFOH.

Nesse espectro é possível identificar sinais a 154,33 ppm referente ao C4 (NHCONH), a 152,61 ppm, do C10, a 151,13 ppm, correspondente ao C7, a 127,70 ppm, referente ao C6, , a 114,98 ppm, de C8, a 112,52 ppm, correspondente ao C9 e sinal a 62,97 ppm referente ao C2.

4.1.2 Síntese do tiomanosídio

A síntese do grupo diretor tiomanosídio teve início a partir da mistura de anômeros α e β do composto *D*-manose. Desta maneira, cada intermediário formado apresentou-se como um produto oleoso de difícil purificação. De acordo com os trabalhos de Kartha e colaboradores (1997) e Wang e colaboradores (2005), a acetilação da manose com anidrido acético em piridina produz quatro açúcares, os quais não são separados por cristalização simples ou coluna cromatográfica. Provavelmente, em nossos primeiros resultados, a partir da *D*-manose como material de partida, pode ter ocorrido formação de mistura de açúcares substituído e não substituído, novos monossacarídeos (manofuranose e manopiranosose), além da mistura de anômeros (Figura 17).

Figura 17: Mecanismo de reação da anomerização e conversão de piranoses em furanoses (Khadem, 1988).

Possivelmente, por essa razão, não conseguimos reproduzir as etapas de cristalização dos produtos intermediários reportados por suas respectivas referências. Além disso, a presença da mistura de açúcares dificultou as etapas subsequentes de síntese dos demais derivados do tiomanosídeo.

Com o intuito de superar esta dificuldade, substituímos a etapa inicial de proteção da manose, formação do pentacetato de manose a partir do anidrido acético, pela formação do pentabenzoato de manose, utilizando como reagente o cloreto de benzoíla. É reportado que a síntese dos açúcares benzoilados pode se apresentar mais vantajosa em relação à síntese dos análogos acetilados, uma vez que os primeiros são mais estáveis e podem ser mais facilmente extraídos em mistura de diclorometano e água (Wang *et al.*, 2005). Assim, o objetivo da mudança do grupo de proteção foi o de obter, em cada etapa de formação dos intermediários, compostos de massa molecular mais elevada e mais apolar que os acetilados, o que poderia facilitar a cristalização e, conseqüentemente, a purificação.

No entanto, apesar da obtenção de compostos sólidos, a purificação dos intermediários benzoilados ainda se mostrou difícil. Da mesma forma que para os intermediários acetilados, é possível que a presença da mistura de açúcares, incluindo os anômeros α e β (Wang *et al.*, 2005), tenha dificultado este processo, bem como a síntese dos intermediários subsequentes.

Somente a partir da aquisição do material de partida α -D-pentacetato de manose, os intermediários obtidos apresentaram-se mais puros.

Resumidamente, a atribuição dos sinais referentes ao RMN ^1H e RMN ^{13}C do tiomanosídeo e de seus intermediários de síntese se encontram nas tabelas II e III, a seguir:

Tabela II: Atribuição por RMN ^1H do tiomanosídio e de seus intermediários de síntese acetilados.

Intermediário	Sinais (ppm)										Figura
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	acetatos (faixa)	NH	CH ₂ S	CH ₃	
Pentacetato de manose	6,06 (d)	5,35 (t)	5,32 (t)	5,27-5,24 (m)	4,11-4,07 (m)	4,29-4,23 (m)	2,21-1,99 (s)	—	—	—	19
ManBr	6,31 (d)	5,73-5,68 (m)	5,45-5,40 (m)	5,34 (d)	4,16-4,11 (m)	4,36-4,19 (m)	2,18-2,00 (s)	—	—	—	26
ManSNH ₂	5,72 (s)	5,22 (d)	5,15 (d)	5,09-5,01 (m)	4,09-4,00 (m)	4,13 (t)	2,15-1,91 (s)	8,30 (s)	—	—	30
ManSCN	5,46 (d)	5,40 (d)	5,37-5,35 (m)	5,33-5,23 (m)	4,24-4,15 (m)	4,33-4,25 (m)	2,21-2,00 (s)	—	3,40 (d)	—	34
Tiomanosídio	4,87 (d)	3,77 (d)	3,67 (d)	3,61 (d)	3,47 (t)	3,58-3,54 (m)	—	8,49	3,42 (d)	3,17 (s)	39

ManBr: brometo de 2,3,4,6- tetra- O-acetil- α -D-manopiranosila, ManSNH₂: bromidrato de 2,3,4,6-tetra- O-acetil- α -D-manopiranosil-1-tiopseudouréia, ManSCN: tetra- O-acetil-1-tio- α -D-manopiranosídio de cianometila; s: singlete; d: dubleto, dd: duplo dubleto, t: tripleto, m: multipeto.

Tabela III: atribuição por RMN ^1H do tiomanosídio e de seus intermediários de síntese benzoilados.

Sinais (ppm)								
Intermediário	H1	H2	H3	H4	H5	H6	benzoatos(faixa)	CH ₂ S
pentabenoato de manose	6,45 (d)	6,15 (t)	5,83 (t)	6,21 (d)	4,55-4,37 (m)	4,79-4,58 (m)	8,17-8,24 (m)	—
ManBzBr	6,58 (d)	6,13 (t)	5,83 (d)	6,20-6,00 (m)	4,55-4,37 (m)	4,79-4,58 (m)	8,15-7,38 (m)	—
ManBzSNH ₂	6,19 (s)	5,70 (d)	5,39 (d)	5,90 (dd)	4,52 (d)	4,65 (d)	8,06-7,31 (m)	—
ManBzSCN	6,17 (s)	5,74 (d)	5,52 (d)	6,13 (d)	4,43 (d)	4,78-4,65 (m)	8,11-7,23 (m)	3,68-3,57 (m)

ManBzBr: brometo de 2,3,4,6- tetra-*O*-benzoil- α -D-manopiranosila, ManBzSNH₂: bromidrato de 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoil- α -D-manopiranosil-1-tiopseudouréia, ManBzSCN: tetra-*O*-benzoil-1-tio- α -D-manopiranosídio de cianometila; s: singleto; d: dubleto, dd: duplo dubleto, t: tripleto, m: multipeto.

4.1.2.1 Pentacetato de manose

No MÉTODO A, utilizou-se como solvente piridina e como reagente anidrido acético. Após evaporação sob pressão reduzida, verificou-se a formação de produto viscoso (oleoso) e incolor, com rendimento de 81%. Na análise de RMN ^1H (Figura 18) verificou-se a presença de dubleto em 6,07 e 5,92 ppm, relativos à presença de anômeros α e β (H_1). Os sinais entre 8,59-7,28 ppm estão relacionados à presença da piridina, utilizada como solvente.

Figura 18: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto pentacetato de manose não purificado.

O produto obtido no MÉTODO B não cristalizou em presença de etanol. Houve formação de um óleo, com rendimento de 76%. Como pode ser visto no RMN ^1H (Figura 19), o produto obtido apresentou maior grau de pureza, apesar da presença de resquícios de ácido acético. As atribuições encontram-se na Tabela II e correspondem ao esperado para a estrutura.

Figura 19: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto pentacetato de manose não purificado.

No RMN ^{13}C (Figura 20) é possível visualizar sinais a 90,41 e 90,27 ppm, indicativos dos anômeros α e β de C1. Sinais entre 77,69-61,91 ppm estão relacionados com os $\text{C}_2\text{-C}_6$. Sinais entre 170,30-167,86 ppm são indicativos das carbonilas $\text{C}_7\text{-C}_{11}$, bem como sinais entre 20,54-20,32 ppm, são referentes aos grupos metilas $\text{C}_{12}\text{-C}_{16}$.

Figura 20: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto pentacetato de manose não purificado.

4.1.2.2 Pentabenzoato de manose

Utilizou-se cloreto de benzoíla como reagente. Em presença de metanol houve formação de precipitado amorfo branco, com rendimento de 96%. A análise de RMN ^1H da figura 21 foi realizada com base no trabalho de D'Accorso e Thiel (1983). As atribuições encontram-se à Tabela III. Sinais entre

8,17-7,24 ppm referem-se aos hidrogênios aromáticos, podendo indicar, também, superposição dos hidrogênios aromáticos dapiridina e do cloreto de benzoila.

Figura 21: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto pentabenoato de manose não purificado.

A utilização de solução de sulfato de cobre 10% durante a extração, para retirar o excesso de piridina, não mostrou diferença significativa. Também não houve melhoria dos valores das integrais nesta região (entre 8,17-7,24 ppm) que se mantiveram elevadas.

4.1.2.3 Brometo de 2,3,4,6- tetra-*O*-acetil- α -*D*-manopiranosila

No MÉTODO A, utilizou-se como solvente ácido acético glacial. Após evaporação sob pressão reduzida, verificou-se formação de produto oleoso escuro, com rendimento de 64%. Na análise de RMN ^1H (Figura 22), atribuições na Tabela II, verificou-se ausência de sinais característicos do produto, principalmente sinal a 6,30 ppm indicativo do H_1 , próximo ao átomo de bromo. O bromo, por ser um melhor grupo de saída, torna este intermediário mais instável e reativo, conforme mecanismo de reação esquematizado na Figura 23.

Adicionalmente, o espectro apresentou poucos sinais a 2,00 ppm, indicativos dos grupos acetatos. É possível que a solução tenha permanecido muito tempo em presença do ácido e os grupos ésteres tenham sofrido hidrólise.

Figura 22: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto brometo de 2,3,4,6- tetra-O-acetil- α -D-manopiranosila não purificado.

Figura 23: Mecanismo de substituição nucleofílica do intermediário brometo de 2,3,4,6- tetra-O-acetil- α -D-manopiranosila.

Explicando melhor a figura 23, sabe-se que o átomo de carbono anomérico é o átomo mais reativo e que a afinidade deste átomo em direção ao nucleófilo depende da natureza do grupo de saída. Neste caso, a configuração do produto de uma substituição nucleofílica no centro anomérico de um açúcar cíclico é influenciada pelos grupos adjacentes ao carbono anomérico, especialmente o átomo de oxigênio do anel e o grupo substituinte em C₂. Quando grupos acetatos e benzoatos estão ligados ao C₂, estes podem formar um anel intermediário de cinco membros, que força o ataque nucleofílico no C₁ do lado oposto a este anel. Desta maneira, os produtos terão o substituinte em C₁ em configuração *trans* em relação ao C₂, mesmo se o grupo anterior estivesse orientado equatorialmente e não favorecido pelo efeito anomérico (Khadem, 1988).

Pequenas modificações no MÉTODO B, baseadas no trabalho de Mitchell e colaboradores (2001), foram realizadas com o objetivo de aperfeiçoar esta metodologia. Rendimentos similares para os solventes 1,2-dicloroetano, clorofórmio e diclorometano foram obtidos. A primeira reação se manteve por , 6 h, no entanto, de acordo com resultados de RMN de ¹H, verificou-se que o produto apresentava-se impuro e poucos sinais entre 2,17-2,11 ppm poderiam indicar a hidrólise dos grupos acetilas (Figura 24). A mesma reação foi realizada por 3 h, apresentando, desta vez, os sinais entre 2,16 e 2,03 ppm.

Figura 24: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto brometo de 2,3,4,6- tetra-O-acetil- α -D-manopiranosila não purificado.

De maneira geral, os compostos formados a partir do material de partida α -D-pentacetato de manose apresentaram-se mais puros. Nesta etapa, tentativa de segunda lavagem do produto para retirar excesso de ácido acético ou resquícios de piridina levou ao desaparecimento de sinais característicos (Figura 25).

Figura 25: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto brometo de 2,3,4,6- tetra-O-acetil- α -D-manopiranosila não purificado.

O intermediário brometo de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosila obtido a partir do material de partida α -D-pentacetato de manose apresentou-se como um óleo alaranjado. Obteve-se rendimento de 84%. As atribuições relativas ao composto encontram-se à Tabela II e o espectro de RMN de ^1H encontra-se à Figura 26.

Figura 26: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto brometo de 2,3,4,6- tetra-O-acetil- α -D-manopiranosila não purificado.

Com relação aos resultados de RMN de ^{13}C , observa-se a presença do sinal a 91,87 ppm (Figura 27), correspondente a C1. É possível verificar ausência do sinal a, aproximadamente, 90,00 ppm, que corresponde ao mesmo carbono C₁ do material de partida, o pentacetato de manose. Sinais entre 83,95-61,26 ppm estão relacionados com os carbonos C₂-C₆. Verificam-se sinais entre 170,64-169,38 ppm, correspondentes às carbonilas C₇-C₁₀. Sinais

entre 20,50-20,32 ppm, relacionados aos grupos metilas C₁₁-C₁₄, também podem ser observados.

Figura 27: Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm) do produto brometo de 2,3,4,6- tetra-O-acetil-α-D-manopiranosila não purificado.

4.1.2.4 Brometo de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosila

Na obtenção desse produto utilizou-se pentabenzoato de manose como material de partida. Após a evaporação do tolueno sob pressão reduzida houve formação de precipitado escuro, com rendimento de 92%. As atribuições desse espectro de RMN ^1H (Figura 28) encontram-se à Tabela III. Os sinais entre 8,15-7,29 ppm, possivelmente, referem-se aos hidrogênios aromáticos do produto sobrepostos a resquícios dos reagentes cloreto de benzoíla e piridina (solvente utilizado na reação de formação do intermediário anterior pentabenzoato de manose). Por outro lado, sinais entre 2,17-2,11 ppm podem estar relacionados ao ácido acético, presente na solução saturada de ácido bromídrico.

Figura 28: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto brometo de 2,3,4,6- tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosila não purificado.

4.1.2.5 Bromidrato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -*D*-manopiranosil-1-pseudotiouréia

Como já comentado anteriormente, de maneira geral, os compostos sintetizados a partir do α -*D*-pentacetato de manose apresentaram-se mais puros. A partir destes intermediários, reações realizadas em períodos menores e com menor quantidade de reagente tiouréia apresentavam ainda sinal do material de partida, bem como presença de resquícios do reagente (MÉTODOS A e B) (Figura 29). Comparando esta mesma reação realizada com os açúcares *D*-manose e *D*-galactose na patente de Davis (2002), o rendimento obtido foi de 14 e 73%, respectivamente, mesmo esta última sendo realizada em tempo reacional menor que uma hora. Uma vez que a *D*-manose e *D*-galactose não são epímeros e suas configurações diferem em mais de um carbono, isto poderia indicar a presença de algum fator estérico capaz de diminuir a reatividade da *D*-manose.

Figura 29: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto bromidrato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-1-pseudotiouréia não purificado.

O MÉTODO C, com tempo de reação entre 4 e 5 horas e com excesso do reagente tiouréia, apresentou-se mais efetivo. Neste, todo material de partida foi consumido, como pode ser visto pelo desaparecimento do sinal a aproximadamente 6,30 ppm referente ao H_1 do intermediário brometo de

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -*D*-manopiranosila. Nesta metodologia, com evaporação de parte do solvente e adição de diclorometano, houve formação de precipitado no balão. Este permaneceu sob resfriamento por mais 2 horas, sendo, então, filtrado. O solvente do material filtrado foi evaporado sob pressão reduzida, verificando-se a formação de produto oleoso alaranjado, com rendimento de 54%.

O composto obtido foi analisado por RMN de ^1H e ^{13}C . A atribuição do espectro de RMN de ^1H (Figura 30) encontra-se à Tabela II.

Figura 30: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do produto bromidrato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -*D*-manopiranosil-1-pseudotiuréia.

Com relação aos resultados de RMN de ^{13}C (Figura 31), verifica-se sinal a 79,12 ppm, que corresponde ao C_1 . Sinal a 111,58 ppm está relacionado com a presença do C_7 . Sinais entre 71,26-62,39 ppm são indicativos de C_2 - C_6 . Verificam-se, ainda, sinais entre 171,93-169,38 ppm, relacionados às

carbonilas C₁₀-C₁₃, bem como sinais entre 20,94-18,63 ppm, correspondentes aos grupos metilas.

Figura 31: Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do produto bromidrato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-1-pseudotiuréea.

4.1.2.6 Bromidrato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-1-pseudotiouréia

Neste método utilizou-se o brometo de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosila como material de partida. Possivelmente, o efeito estérico comentado no item 4.1.2.5 para os métodos A e B seja ainda maior na formação do intermediário benzoilado devido à presença de grupos protetores volumosos. Na análise do espectro de RMN ^1H (Figura 32) sinal do material de partida a 6,58 ppm continua presente, bem como outras impurezas em região próxima.

Figura 32: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) do produto bromidrato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoi- α -D-manopiranosil-1-pseudotiouréia não purificado.

Purificação por cromatografia em coluna, deste último, foi realizada. A fase móvel escolhida foi acetato de etila/tolueno (1:1). As atribuições de RMN ^1H (Figura 33) encontram-se à Tabela II.

Figura 33: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do produto bromidrato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- α -D-manopiranosil-1-pseudotiouréia.

4.1.2.7 Tetra-O-acetil-1-tio- α -D-manopiranosídeo de cianometila

Neste método utilizou-se o bromidrato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-1-pseudotioréia como material de partida. Após extração e evaporação sob pressão reduzida, verificou-se formação de produto oleoso alaranjado com rendimento de 62%. Analisando o espectro de RMN ^1H (Figura 34) é possível identificar os sinais correspondentes ao produto esperado (Tabela II).

Figura 34: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto tetra-O-acetil-1-tio- α -D-manopiranosídeo de cianometila não purificado.

Com relação aos resultados de RMN de ^{13}C , verifica-se aparecimento dos sinais 92,90-92,11 ppm (Figura 35), que correspondem, provavelmente, ao C_1 , possivelmente de dois anômeros. É possível observar, também, sinal a 30,28 ppm, relacionado ao C_7 , bem como sinal a 114,6 ppm, que corresponde ao C_8 . Sinais entre 77,57- 62,67 ppm estão relacionados aos C_2 - C_6 . Verificam-

se, ainda, sinais entre 170,98-169,93 ppm, que correspondem às carbonilas C₉ e C₁₂ bem como sinais entre 20,91-19,98 ppm, relacionados às metilas C₁₃-C₁₆.

Figura 35: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto tetra-*O*-acetil-1-tio- α -*D*-manopiranosídeo de cianometila não purificado.

4.1.2.8 Tetra-*O*-benzoil-1-tio- α -*D*-manopiranosídeo de cianometila

Utilizou-se o bromidrato de 2,3,4,6-*O*-benzoil- α -*D*-manopiranosil-1-tiopseudouréia como material de partida. Formou-se precipitado escuro, o qual

foi filtrado e analisado. O espectro de RMN ^1H (Figura 36) indicou a presença de material de partida e impurezas acumuladas durante todo processo de síntese dos intermediários.

Figura 36: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto tetra-O-benzoyl-1-tio- α -D-manopiranosídeo de cianometila não purificado.

Purificação por cromatografia preparativa foi realizada. A fase móvel escolhida foi acetato de acetato de etila/hexano (1:2). A atribuição da análise por RMN ^1H (Figura 37) encontra-se à Tabela III.

Figura 37: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do produto tetra-O-benzoyl-1-tio- α -D-manopiranosídeo de cianometila.

4.1.2.9 1-Tio- α -D-manopiranosídeo de 2-imino-2-metoxietila

Análise do espectro de RMN ^1H (Figura 38) do intermediário obtido pelo MÉTODO A, a partir do 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-1-tio-*D*-manopiranosídeo-cianometil, indicou que produto não se formou. Apesar da tentativa de purificação dos intermediários benzoilados anteriores, as quantidades obtidas foram insatisfatórias para dar continuidade às etapas seguintes. Não houve tentativa de purificação deste composto.

Figura 38: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) da tentativa de síntese do produto 1-Tio-*D*-manopiranosídeo de 2-imino-2-metoxietila não purificado.

No MÉTODO B, obteve-se produto oleoso alaranjado, com rendimento de 60%. Dificuldade desta etapa é o acompanhamento da reação por CCD, possivelmente devido à maior polaridade do produto formado. A presença de sinais referentes aos grupos acetatos no espectro RMN ^1H indica que a reação não havia se completado quando finalizada.

Purificação por cromatografia em coluna foi realizada. A fase móvel escolhida foi acetato de etila/hexano (1:1). As atribuições da análise por RMN ^1H (Figura 39) encontram-se à Tabela II.

Figura 39: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do 1-Tio- α -D-manopiranosídeo de 2-imino-2-metoxietila.

Com relação aos resultados de RMN de ^{13}C (Figura 40), verifica-se presença de sinal a 94,06 ppm, relacionado ao C₁. Pode-se observar, também, sinal a 175,26 ppm, que corresponde ao C₈, bem como sinal a 30,07 ppm, que

corresponde ao C₇. Sinais entre 77,04- 61,22 ppm podem estar relacionados aos C₂-C₆. Verifica-se, ainda, sinal a 48,55 ppm, relacionado ao C₉.

Figura 40: Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) do produto 1-Tio-α-D-manopiranosídeo de 2-imino-2-metoxietila não purificado.

4.1.3 Síntese do intermediário carboximetildextrano (CMD)*

* A representação dos grupos substituintes dos produtos esquematizados neste item (4.1.3) é aleatória.

Os espectros de RMN ^1H dos produtos dos MÉTODOS B (figura 41) e C (Figura 42) mostraram-se semelhantes. Nas duas metodologias verificou-se aparecimento de sinais a 4,05 e 4,14 ppm que podem estar relacionados com os hidrogênios H_8 - H_9 , os quais não estavam presentes no espectro do precursor dextrano (Figura 43).

Figura 41: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, D_2O , δ ppm) do produto carboximetildextrano (MÉTODO B).

É importante considerar que os polímeros apresentam espectros complexos e, não raro, é difícil a atribuição da multiplicidade dos sinais. Pela análise de RMN de ^1H do produto do MÉTODO C (Figura 42), verifica-se aparecimento de sinais entre 4,15-4,00 ppm, que podem estar relacionados com os hidrogênios H_8 - H_9 . É possível visualizar, também, sinal a 5,10 ppm, que se refere, provavelmente, ao H_1 da molécula de glicose substituída (Morais *et al.*, 2011). Pode-se observar, também, sinal a 4,91 ppm, que pode estar relacionado ao H_1 da molécula de glicose não-substituída (última molécula de glicose do polímero). Sinais entre 3,95-3,39 ppm correspondem, possivelmente, aos hidrogênios H_2 - H_7 .

Figura 42: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, D_2O , δ ppm) do produto carboximetildextrano (MÉTODO C).

Figura 43: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, D₂O, δ ppm) do precursor dextrano.

Com relação aos resultados da análise de RMN de ¹³C (Figura 44), é possível observar sinais entre 178,95-177,78 ppm, que se referem, provavelmente, ao C₈, carbonílico. Sinais entre 98,62-97,73 ppm podem estar relacionados à presença de C₁ substituído e entre 96,53-95,75 ppm à presença do carbono anomérico C₁ não-substituído (última molécula de glicose do polímero). É possível observar sinais entre 79,68-65,42 ppm, que se referem, provavelmente, aos C₂-C₆.

Figura 44: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O , δ ppm) do produto carboximetildextrano (MÉTODO C).

4.1.4 Síntese do intermediário carboximetildextrano-etilenodiamina*

* A representação dos grupos substituintes dos produtos esquematizados neste item (4.1.4) é aleatória.

Pela análise de RMN de ^1H (Figura 45) verifica-se presença dos sinais a 5,16 ppm, que se refere, provavelmente, ao H_1 da molécula de glicose substituída e 4,84 ppm, que pode estar relacionado ao H_1 da molécula de glicose não substituída (Moraes *et al.*, 2011). Sinais entre 3,95-3,39 ppm, que correspondem, possivelmente, aos hidrogênios $\text{H}_2\text{-H}_7$ e sinais entre 4,20-4,05 ppm, relacionados aos $\text{H}_8\text{-H}_9$, também podem ser vistos. É possível observar, ainda, sinal a 2,87-2,80 ppm, que poderia indicar a presença de $\text{H}_{12}\text{-H}_{13}$. No entanto, não é possível visualizar sinal a aproximadamente 5,00 ppm. Cabe ressaltar que esse sinal é de difícil identificação devido à matriz polimérica complexa. Sinais entre 1,98-1,19 ppm correspondem, possivelmente, à presença de EDU, produto resultante do EDC utilizado na condensação.

Figura 45: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, D_2O , δ ppm) do produto carboximetildextrano-etilenodiamina não purificado.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 46) também não se mostrou conclusivo, pois não é possível visualizar todos os sinais da glicopirranose,

entre 90 e 60 ppm. Os sinais 38,43 e 36,56 ppm podem indicar a presença de C9 e C10. Sinal a 154,55 ppm pode estar relacionado com C₈.

Figura 46: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O , δ ppm) do produto carboximetildextrano - etilenodiamina não purificado.

4.1.5 Síntese do intermediário carboximetildextrano-manose*

* A representação dos grupos substituintes dos produtos esquematizados neste item (4.1.5) é aleatória.

Considerando-se que a massa de tiomanosídio obtida era, ainda, reduzida e com o intuito de se tentar, então, a obtenção de derivado dirigido de manose, ainda que menos estável, procedeu-se à reação de ligação da manose ao carboximetildextrano.

Ainda que de difícil interpretação—o espectro apresentou baixa resolução e sinais completamente arredondados—tentou-se analisar o espectro de análise de RMN de ^1H (Figura 47). Verifica-se presença dos sinais a 5,10 ppm e a 4,91 ppm, que podem estar relacionados à presença dos H_1 substituído e não substituído do polímero carboximetildextrano. Aparecimento do sinal a 4,83 ppm refere-se, possivelmente, ao H_1' do hidrogênio da manose. Sinais entre 4,17- 4,00 ppm podem estar relacionados aos H_8 - H_9 , bem como a presença dos sinais entre 3,97- 3,29 ppm refere-se, possivelmente, aos H_2 - H_7 das moléculas de glicose do dextrano e H_2' - H_7' da molécula de manose.

Figura 47: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, D₂O, δ ppm) ampliado do produto carboximetildextrano - manose não purificado.

Com relação à análise de RMN de ¹³C (Figura 48) é possível observar os sinais 99,33 ppm e a 97,39 ppm, que podem estar relacionados, respectivamente, com os C₁ da molécula de glicose substituída e não-substituída do polímero carboximetildextrano. Sinal a 81,23 ppm refere-se, possivelmente, ao C₁' da molécula de manose. Sinal a 179,17 ppm pode estar relacionado com a presença de C₈. É possível observar sinais entre 74,86-66,79 ppm, os quais se referem, provavelmente, aos C₂-C₆ e C₂'-C₆' do carboximetildextrano e da manose.

Figura 48: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O , δ ppm) do produto carboximetildextrano - manose não purificado.

4.1.6 Síntese do intermediário carboximetildextrano–manose-mexicanina*

* A representação dos grupos substituintes dos produtos esquematizados neste item (4.1.6) é aleatória.

É importante mencionar que a mexicanina, isômero da helenalina, foi utilizada como modelo de reação. Ainda que o modelo não seja o ideal, foi necessário esse processo, uma vez que dispúnhamos de quantidade muito reduzida de helenalina, como ocorre, normalmente, com produtos naturais. A mexicanina também apresenta atividade, apesar de menor que a helenalina.

Pela análise de RMN de ^1H (Figura 49) verifica-se presença dos sinais característicos dos açúcares glicose e manose (entre 5,61-3,46 ppm). É possível identificar, também, sinais entre 7,75-7,72 ppm e 6,13-6,05 ppm, os quais podem estar relacionados aos átomos de hidrogênio próximos às ligações duplas H_{12} , H_{13} e H_{20} . Os demais sinais da molécula mexicanina se superpõem aos sinais dos açúcares, entre 4,98-3,46 ppm. Sinais entre 2,33-2,28 ppm podem se referir aos H_{11} e H_{14} e sinais entre 1,39-1,06 ppm representam, provavelmente, contaminação com EDU. A diminuição dos sinais referentes ao anel dos açúcares glicose e manose pressupõe o excesso de mexicanina, não ligada covalentemente. O produto foi lavado com clorofórmio para retirar o excesso de mexicanina e filtrado. Na análise por RMN ^1H verificou-se ausência dos sinais característicos da mexicanina. Tal fato leva a duas suposições: ou não houve reação com a mexicanina ou a purificação rompeu a ligação com o polissacarídeo.

Figura 49: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, D₂O, δ ppm) do produto carboximetildextrano-manose - mexicanina não purificado.

4.1.7 Síntese do intermediário carboximetildextrano–manose–polipropilenoglicol*

* A representação dos grupos substituintes dos produtos esquematizados neste item (4.1.7) é aleatória.

Pela análise de RMN de ^1H (Figura 50) verifica-se presença dos sinais a 5,20 ppm e a 4,97 ppm, que podem estar relacionados à presença dos H_1 substituído e não-substituído do polímero carboximetildextrano. Aparecimento do sinal a 4,79 ppm refere-se, possivelmente, ao H_1' do hidrogênio da manose. Sinais entre 3,99- 3,57 ppm referem-se, possivelmente, aos $\text{H}_2\text{-H}_7$ das moléculas de glicose do dextrano e $\text{H}_2'\text{-H}_7'$ da molécula de manose. Os sinais do polipropilenoglicol referentes aos H_{10} , H_{11} e H_{12} caem entre 3,70 e 3,30 ppm e se superpõem aos hidrogênios da manose e glicose. Sinal a 1,13 ppm pode estar relacionado com a presença de EDU.

Figura 50: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, D_2O , δ ppm) do produto carboximetildextrano-manose - polipropilenoglicol não purificado.

4.1.8 Hidrogenação do ácido anacárdico

Análise do espectro de RMN ^1H (Figura 51) indica a redução da cadeia lateral do material de partida, como pode ser visto pelo desaparecimento dos sinais entre 5,85 e 5,01 ppm, presentes no precursor (Figura 52). No espectro 50 é possível visualizar sinais entre 1,52 e 0,78 ppm relacionados com os grupos metilenos da cadeia lateral ($\text{H}_8\text{-H}_{21}$), bem como tripleto a 2,89 ppm indicativo dos H_7 . Sinais entre 7,29 e 6,67 ppm referem-se aos hidrogênios do anel aromático H_3 , H_4 e H_5 .

Figura 51: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do ácido anacárdico reduzido não purificado.

Figura 52: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do ácido anacárdico.

4.1.9 Síntese do intermediário heptanoato do ácido anarcárdico reduzido

Com o intuito de proteger o grupo carboxila livre do ácido anacárdico reduzido, procedeu-se à reação de esterificação com o 1-heptanol. Obteve-se produto bastante oleoso, devido à presença do álcool não ligado covalentemente. O produto foi, então, purificado por cromatografia em coluna. A fase móvel escolhida foi acetato de etila/hexano (2:8). Na análise por RMN ^1H (Figura 53) é possível visualizar sinais entre 1,55 e 0,85 ppm referentes aos grupos metilênicos ($\text{H}_8\text{-H}_{21}$), tripleto a 2,89 ppm indicativo dos H_7 , tripleto a 4,42 ppm, relacionado com o H_{22} , e multiplete entre 4,14-4,07 ppm, referente ao H_{23} . Sinais entre 7,80-6,72 ppm são indicativos dos hidrogênios aromáticos ($\text{H}_3\text{-H}_5$).

Figura 53: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do intermediário heptanoato do ácido anarcárdico reduzido.

4.1.10 Síntese do intermediário do etanoato do ácido anacárdico reduzido

Com o mesmo intuito e a fim de facilitar a obtenção e purificação do composto protegido, procedeu-se à reação de esterificação com o etanol.

Na análise por RMN ^1H (Figura 54) é possível visualizar sinais entre 1,54 e 0,87 ppm referentes aos grupos metilênicos ($\text{H}_8\text{-H}_{21}$), tripleto a 2,91 ppm indicativo dos H_7 , multiplete entre 4,14-4,07 ppm relacionado com o H_{22} e multiplete entre 3,72-3,69 ppm indicativo do H_{23} . Sinais entre 7,67-6,69 ppm referem-se aos hidrogênios aromáticos ($\text{H}_3\text{-H}_5$) e sinal a 8,96 ppm pode ser indicativo da presença de ácido *p*-toluenossulfônico, impurificando o produto.

Figura 54: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) do intermediário do etanoato do ácido anacárdico reduzido.

4.1.11 Síntese do intermediário éster etílico do ácido anacárdico-ácido monocloroacético

Considerando-se que o éster etílico do ácido anacárdico reduzido foi obtido e isolado com maior facilidade, procedeu-se à reação com o ácido monocloroacético, formando-se o éter derivado, com o grupo carboxila livre para a reação com o composto bioativo.

Na análise do RMN ^1H (Figura 55) verificam-se sinais entre 1,67 e 0,85 ppm referentes aos grupos metilênicos ($\text{H}_8\text{-H}_{21}$), tripleto a 2,89 ppm indicativo dos H_7 , multiplete entre 4,14-4,07 ppm relacionado com o H_{22} , multiplete entre 3,72-3,69 ppm indicativo do H_{23} e multiplete entre 4,44-4,37 referente ao H_{24} . Sinais entre 7,30-6,69 ppm referem-se aos hidrogênios aromáticos ($\text{H}_3\text{-H}_5$) e sinal a 11,19 ppm indica presença de hidrogênio ácido do grupo carboxila.

O composto assim obtido será matéria-prima para a ligação do composto bioativo e do tiomanosídeo. Vale ressaltar que tal fármaco dirigido, pela presença do tiomanosídeo, parte polar, e do ácido anacárdico, parte apolar, representa, por si só, uma unidade de transporte formadora de micela. Ademais, o ácido anacárdico também apresenta atividade tripanomicida, o que permitirá a obtenção de forma latente diferenciada, misto de fármaco recíproco dirigido e fármaco dirigido, dependendo do mecanismo de liberação do composto bioativo do transportador.

4.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DAS CARBOXILAS LIVRES DO CARBOXIMETILDEXTRANO

Apenas titulação do intermediário CMD com solução de hidróxido de sódio 0,1 M apresentou resultado conclusivo. Para este, obteve-se grau de substituição de 3,5 mmol/g de amostra. No entanto, dificuldade na determinação do grau de substituição das carboxilas livres, após ligação de um

dos substituintes ao polímero carboximetildextrano nos levou a tentar nova metodologia por RMN ^1H .

O cálculo do GS foi realizado através da razão entre a integral dos hidrogênios metilênicos ($\text{H}_7\text{-H}_8$) dos grupos carboximetila, que aparecem em, aproximadamente, 4,3-4,0 ppm, e as integrais dos hidrogênios $\text{H}_2\text{-H}_7$, pertencentes ao anel $\alpha\text{-D}$ -glicopiranosil do dextrano, que aparecem, provavelmente, entre 3,9-3,2 ppm (Caraschi, Campana Filho, 1999).

De acordo com o trabalho de Caraschi e Campana Filho (1999), o GS é definido como o número médio de grupos hidroxila substituídos por unidade de D -glicopiranosil da cadeia polimérica e da distribuição dos grupos carboximetila.

Na figura 56 é possível visualizar os espectros dos polímeros (a) dextrano, (b) carboximetildextrano e (c) carboximetildextrano ligado à manose com a integral das regiões calculadas. No espectro do dextrano verifica-se ausência dos sinais entre 4,30-4,00 ppm, os quais podem ser vistos nas demais amostras. O carboximetildextrano apresentou grau de substituição igual a 1,39. E este valor diminuiu após ligação da manose, GS igual a 0,43.

Figura 56: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, D_2O , δ ppm) dos produtos (a) dextrano, (b) carboximetildextrano e (c) carboximetildextrano - manose.

4.3 MODELAGEM MOLECULAR

Com o objetivo de obter informações preliminares sobre a liberação dos constituintes dos monômeros das micelas formadas pelo tiomanosídio–ácido anacárdico – hidroximetilnitrofural (Mon1) e tiomanosídio – ácido anacárdico – helenalina (Mon2), estudos de modelagem molecular foram realizados (Figura 14).

Na simulação de DM a 100 ps (300 K), o confôrmere de menor energia mínima de Mon1 selecionado, a partir do equilíbrio, apresentou valor de energia total igual a 35,95 kcal/mol. O método A₁ foi substituído pelo método A₂ porque a cadeia carbônica de Mon2 apresentava-se muito distinta dentre os confôrmers de menor energia localizados na região de equilíbrio da dinâmica. Desta forma, para ambos os confôrmers (Mon1 e Mon2) preferiu-se aquecer lentamente o sistema, antes de iniciar a dinâmica maior.

Os confôrmers de Mon1 (Figura 57) e Mon2 (Figura 58) apresentaram valores de energia total de -40,92 kcal/mol e 70,87 kcal/mol, respectivamente. Logo, Mon1 parece ser mais estável que Mon2. Em ambos os monômeros, observou-se que o carbono C1 do grupo diretor é mais suscetível ao ataque nucleofílico enzimático por apresentar menor densidade eletrônica (cor mais azulada) e, também, impedimento estérico menor que o C2.

Figura 57: Visualização tridimensional dos modelos (bola-palito e CPK) e mapa de potencial eletrostático (MPE) do conformero Mon1. MPE visualizado em superfície Connolly, faixa de coloração de -7.1 (vermelho) a +7.1 e-2 (azul). Os átomos de carbono estão em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, enxofre em laranja e hidrogênio em branco.

Figura 58: Visualização 3D dos modelos (bola-palito e CPK) e MPE do conformero Mon2. MPE visualizado em superfície Connolly, faixa de coloração de -7.1 (vermelho) a +7.1 e-2 (azul). Os átomos de carbono estão em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, enxofre em laranja e hidrogênio em branco.

É importante ressaltar que este trabalho representa um estudo prévio sobre a liberação dos constituintes dos monômeros das micelas de Mon1 e Mon2. Possivelmente, com a adição de mais monômeros e formação da micela, estes sofrerão rearranjos, o que dificultaria o acesso rápido de esterases inespecíficas sobre os princípios ativos. Além disso, apesar da menor densidade eletrônica em C1, o que facilitaria o ataque nucleofílico nesta região, a presença do átomo de enxofre ligado ao grupo amidina ($\text{S-CH}_2\text{-CNH}_2\text{NH}$) confere estabilidade a esta porção da molécula (Lee *et al.*, 1976).

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Realizou-se a síntese do tiomanosídio (grupo diretor) e de seus quatro intermediários: pentacetato de manose, brometo de 2,3,4,6- tetra-*O*-acetil- α -*D*-manopiranosila, bromidrato de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -*D*-manopiranosil-1-tiopseudouréia e tetra-*O*-acetil-1-tio- α -*D*-manopiranosídio de cianometila. Diferentes metodologias foram utilizadas e os intermediários obtidos a partir do anômero α -*D*-pentacetato de manose apresentaram maior grau de pureza.

Paralelamente, realizou-se a carboximetilação do dextrano (CMD) por três diferentes métodos, os quais se mostraram satisfatórios. Ligação do CMD à manose (grupo diretor) foi realizada e indícios de formação são verificados no espectro de RMN ^1H pela diminuição do número do grau de substituição previamente obtido. Tentativa de ligação do CMD ao espaçante etilenodiamina e ao polietilenoglicol também foram realizadas. No entanto dificuldades para caracterização dos espectros de RMN ^1H destes intermediários foram encontradas, possivelmente devido à pequena quantidade substituída e sobreposição de sinais. É importante ressaltar, ainda, os problemas quanto à remoção do excesso de compostos de partida residuais como o polipropilenoglicol e mexicanina, que se manteve mesmo após a diálise.

A síntese do fármaco dirigido formador de micela do ácido anacárdico–helenalina–tiomanosídio foi iniciada. Os primeiros resultados por RMN ^1H indicaram a ligação do grupo de proteção 1-propanol e etanol, bem como funcionalização da hidroxila. As etapas sintéticas subsequentes estão em andamento.

Por fim, os estudos de modelagem molecular sobre a liberação dos constituintes das unidades micelares formadas pelo tiomanosídio, ácido anacárdico e fármaco (NFOH ou helenalina) apontaram menor densidade eletrônica na carbonila que liga o grupo diretor ao ácido anacárdico (C1), o que poderia facilitar o ataque nucleofílico nesta região. No entanto, a presença do átomo de enxofre ligado ao grupo amidina ($\text{S-CH}_2\text{-CNH}_2\text{NH}$) confere estabilidade a esta porção da molécula.

PERSPECTIVAS

6 PERSPECTIVAS

Considerando-se o interesse da continuidade do presente trabalho, visto a importância das doenças às quais se destinam os derivados propostos, há necessidade de se proceder aos itens relacionados a seguir:

- ❖ Ligação do tiomanosídeo ao ácido anacárdico e ao polímero carboximetildextrano;
- ❖ Obtenção do derivado final do ácido anacárdico reduzido;
- ❖ Estabelecimento de métodos mais apropriados de purificação dos derivados para os quais há indicativos de sua obtenção;
- ❖ Utilização de várias técnicas analíticas para a determinação estrutural acurada dos derivados obtidos.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, M.J.; Bermejo, P.; Valverde, S.; Villar, A. Inhibition by hydroxyachillin, sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum*, of PMA-induced mouse ear. *Planta Medica*, v.60, p.228-231, 1994.
- Adrian, J.E.; Poelstra, K.; Scherphof, G.L.; Meijer, D.K.; van Loenen-Weemaes, A.M.; Reker-Smit, C.; Morselt, H.W.; Zwiers, P.; Kamps, J.A. Effects of a new bioactive lipid-based drug carrier on cultured hepatic stellate cells and liver fibrosis in bile duct-ligated rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.321, p.536-543, 2007.
- Agostini-Costa, T.S.; Jales, K.A.; Garruti, D.S.; Padilha, V.A.; De Lima, J.B.; Aguiar, M.J.; Paiva, J.R. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale var nanum* disponíveis no nordeste do Brasil. *Ciência Rural*, v.34, p.1075-1080, 2004.
- Akilov, O.E.; Kasuboski, R.E.; Carter, C.R.; McDowell, M.A. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. *Journal of Leukocyte Biology*, v.81, p.1188–1196, 2007.
- Alani, W.G.; Bae, Y.; Rao, D.A.; Kwon, G.S. Polymeric micelles for the pH-dependent controlled, continuous low dose release of paclitaxel. *Biomaterials*, v.31, p.1765-1772, 2010.
- Al-Hallak, M.H.; Sarfraz, M.K.; Azarmi, S.; Kohan, M.H.; Roa, W.H.; Löbenberg, R. Microcalorimetric method to assess phagocytosis: macrophage-nanoparticle interactions. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, v.13, p.20-29, 2011.
- Areschoug, T.; Gordon, S. Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology*, v.11, p.1160-1169, 2009.
- Arnason, J.T.; Isman, M.B.; Philogene, J.R.; Waddel, T.G. Mode of action of the sesquiterpene lactone, tenulin from *Helenium amarum* against herbivorous insects. *Journal of Natural Products*, v.50, p.690 695, 1987.
- Astelbauer, F.; Walochnik, J. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.38, p.118-124, 2011.

- Barbosa, L.C.A.; Maltha, C.R.A.; Borges, E.E.L. Síntese e avaliação da atividade fitotóxica de lactonas derivadas do 2,4-dimetil-8-oxabicyclo[3.2.1]-oct-6-en-3-ona. *Química Nova*, v. 25, p.203-208, 2002.
- Barreiro, E.J.; Rodrigues, C.R.; Albuquerque, M.G.; Sant'Anna, C.M.R.; Alencastro, R.B. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em Química Medicinal. *Química Nova*, v.20, p.300-310, 1997.
- Barrera, P.A.; Jimenez-Ortiz, V.; Tonn, C.; Giordano, O.; Galanti, N.; Sosa, M.A. Natural sesquiterpene lactones are active against *Leishmania mexicana*. *Journal of Parasitology*, v.94, p.1143-1149, 2008.
- Barreto, M.L.; Teixeira, M.G.; Bastos, F.I.; Ximenes, R.A.A.; Barata, R.B.; Rodrigues, L.C. Successes and failures in the control of infectious disease in Brasil: social and environmental context, policies, interventions and researchs needs. *Lancet*, v.377, p.1877-1889, 2011.
- Baruah, N.C.; Sarma, J.C.; Barua, N.C.; Sarma, S.; Sharma, R.P. Germination and growth inhibitory sesquiterpene lactones and a flavone from *Tithonia diversifolia*. *Phytochemistry*, v.36, p.29-36, 1994.
- Basu, M.K. Liposomal Delivery of antileishmanial agents. *Journal of Applied Research*, v.5, p.221-236, 2005.
- Ben Salah, A.; Zakraoui, H.; Zaatour, A.; Ftaiti, A.; Zaafouri, B.; Garraoui, A.; Oliaro, P.L.; Dellagi, K.; Ben Ismail, R. A randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.53, p.162-166, 1995.
- Bestetti, R.B.; Martins, C.A.; Cardinalli-Neto, A. Justice where justice is due: A posthumous Nobel Prize to Carlos Chagas (1879–1934), the discoverer of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *International Journal of Cardiology*, v.134, p.9-16, 2009.
- Blanco, E.; Hsiao, A.; Mann, A.P.; Landry, M.G.; Meric-Bernstam, F.; Ferrari, M. Nanomedicine in cancer therapy: innovative trends and prospects. *Cancer Science*, v.102, p.1247–1252, 2011.

- Boger, D.L.; Teramoto, S.; Zhou, J. Key synthetic analogs of bleomycin A2 that directly address the effect and role of the disaccharide: demmannosylbleomycin A2 and α -D-mannopyranosyldeglycobleomycin A2. *Journal of the American Chemical Society*, v.117, p.7344-7356, 1995.
- Bonner, W.A.; Kahn, J.E. A study of some S- (Polyacetyl- β - D- glycopyranosyl)-thiuronium halides. *Journal of the American Chemical Society*, v.73, p.2241-2245, 1951.
- Bouttemy, M. Contribution à l' etude des carboxymethylcelluloses. Preparation des carboxyméthylcelluloses de hauts degrés de substitution. *Bulletin de la Société Chimica Française.*, v.2, p.1750-1756, 1960.
- Bray, P.G.; Barrett, M.P.; Ward, S.A.; Koning, H.P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology*, v.19, p.232–239, 2003.
- Brener, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology.*, v.27, p.347-382, 1973.
- Bromberg L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, v.128, p.99-112, 2008.
- Caraschi, J.C.; Campana Filho, S.P. Influência do grau de substituição e da distribuição de substituintes sobre as propriedades de equilíbrio e carboximetilcelulose em solução aquosa. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.9, p.70-77, 1999.
- Carranza-Tamayo, C.O.; Assis, T.S.M.; Neri, A.T.B.; Cupolillo, E.; Rabello, A.; Romero, G.A.S. Prevalence of leishmania infection in adult HIV/ AIDS patients treated in a tertiary-level care center in Brasilia, Federal District, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.103, p.743-748, 2009.
- Carvalho, P. B.; Ramos, D. C. C.; Rodegueri, F. A.; Cotrim, P. C.; Ferreira, E. I. Synthesis and in vitro evaluation of potential anti-leishmanial targeted drugs of pyrimethamine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 92, p. 2109-2116, 2003.
- Chakraborty, P.; Ghosh,D.; Basu,M.K. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Parasitology*, v.87, p.1023–1027, 2001.

- 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.
- Chen, L.; Li, Y.; Zhao, Q.; Peng, H.; Hou, T. ADME evaluation in drug discovery. Predictions of P-glycoprotein inhibitors using recursive partitioning and naive Bayesian classification techniques. *Molecular Pharmacology*, v.8, p.889-900, 2011.
- Chidambaram, M.; Manavalan, R.; Kathiresan K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v.14, p.67-77, 2011.
- Chipowsky, S.; Lee, Y.C.; Synthesis of 1-thioaldosides having na amino group at the aglycon terminal. *Carbohydrate Research*, v.31, p.339-346, 1973.
- Choi, K.C.; Bang, J.Y.; Kimc, P.; Kimd, C.; Song, C.E. Amphotericin B-incorporated polymeric micelles composed of poly(d,l-lactide-co-glycolide)/dextran graft copolymer. *International Journal of Pharmaceutics*, v.355, p. 224–230, 2008.
- Chung, M.C. *Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos*. São Paulo, 1996. 196 p. [Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo].
- Chung, M.C; Guido, R.V.; Martinelli, T.F.; Gonçalves, M.F.; Polli, M.C.; Botelho, K.C.; Varanda, E.A.; Colli, W.; Miranda, M.T.; Ferreira, E.I. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH 121): a new nitrofurazone prodrug. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.11, p.4779-4783, 2003.
- Chung, M.C.; Silva, A.T.A.; Castro, L.F.; Guido, R.V.C.; Nassute, J.C.; Ferreira, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, v.41, p.155-179, 2005.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CNPq e Fapesp firmam acordo com laboratório britânico para apoiar pesquisas no Brasil, <http://www.cnpq.br/saladeimprensa/noticias/2011/1020b.htm>, acessado em 22/11/2011.
- Correia, S.J.; David, J.P.; David, J.M. Metabólitos secundários de espécies de anacardiaceae. *Química Nova*, v.29, p.1287-1300, 2006.

- 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.
- Crivori, P.; Pennella, G.; Magistrelli, M.; Grossi, P.; Giusti, A.M. Predicting myelosuppression of drugs from in silico models. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v.51, p.434-445, 2011.
- Cui, L.; Miao, J.; Furuya, T.; Fan, Q.; Li, X.; Rathod, P.K.; Su, X.Z.; Cui, L. Histone acetyltransferase inhibitor anacardic acid causes changes in global gene expression during *in vitro Plasmodium falciparum* development. *Eukaryotic Cell*, v.7, p.1200-1210, 2008.
- D'Accorso, N.B.; e Thiel, I.M.E. Proton and c-13 nuclear magnetic resonance spectra of some benzoylated aldohexoses. *Carbohydrate Research*, v.124, p.177-184, 1983.
- Dahl, S.G.; Sylte, I. Molecular modelling of drug targets: the past, the present and the future. *Basic Clinical & Pharmacology & Toxicology*, v.96, p.151-155, 2005.
- Danesh-Bahreini, M.A.; Shokri, J.; Samiei, A.; Kamali-Sarvestani, E.; Barzegar-Jalali, M.; Mohammadi-Samani, S. Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chitosan nanoparticles containing Leishmania superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/c mice. *International Journal of Nanomedicine*, v.6, p.835-842, 2011.
- Davis, B. Lectin-directed prodrug delivery system. WO 02/080980 A1, 17 out. 2002. 126p.
- Davis, B.G.; Seymour, L.W.; Fisher, K. Modified virus. WO 2006/008513 A1, 26 jan. 2006. 51p.
- Davies, C.; Cardozo, R.M.; Negrette, O.S.; Mora, M.C.; Chung, M.C.; Basombrío, M.A. Hydroxymethylnitrofurazone is active in a murine model of Chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.54, p.3584-3589, 2010.
- Desjeux, P.; Alvar, J. Leishmania/HIV. Co-infections: epidemiology in Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.97, p.3-15, 2003.
- Dewar, M.J.S.; Healy, E.F.; Holder, A.J.; Yuan, Y.C. Comments on a comparison of AM1 with the recently developed PM3 method. *Journal of Computational Chemistry*, v.11, p.541-542, 1990.

- Di Giorgio, C.; Faraut-Gambarelli, F.; Imbert, A.; Minodier, P.; Gasquet, M.; Dumon, H. Flow cytometric assessment of amphotericin B susceptibility in *Leishmania infantum* isolates from patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.44, p.71-76, 1999.
- Doherty, D. *MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software - User's Guide*, version 3.2, The Chem21 Group Inc.: Lake Forest, IL, 1997.
- Ekins, S.; Mestres, J.; Testa, B.B. In silico pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. *Journal of Pharmacology*, v.152, p.21-37, 2007.
- Fan, N.; Duan, K.; Wang, C.; Liu, S.; Luo, S.; Yu, J.; Huang, J.; Li, Y.; Wang, D. Fabrication of nanomicelle with enhanced solubility and stability of camptothecin based on α,β -poly[(*N*-carboxybutyl)-l-aspartamide]-camptothecin conjugate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.75, p.543-549, 2010.
- Fiocruz, Ministério da Saúde:
<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=10>, acessado em 10/06/2008.
- Gazi, U.; Pomares, L.M. Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*, v.214, p.554-561, 2009.
- Garcia, E.S.; Azambuja, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today*, v.7, p.240-244, 1991.
- Giacotto, C.; Santerre, R.E.; Vernon, J.A. Drug prices and research and development investment behavior in the pharmaceutical industry. *Journal of Law Economics*, v.48, p.195-214, 2005.
- Golenser, J.; Frankenburg, S.; Ehrenfreund, T.; Domb, A.J. Efficacious treatment of experimental leishmaniasis with amphotericin b-arabinogalactan water-soluble derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, p.2209-2214, 1999.
- Goldstein, J.L.; Ho, Y.K.; Basu, S.K.; Brown, M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.76, p.333-337, 1979.
- Gough, P.J.; Gordon, S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. *Microbes and Infection*, v.2, p.305-311, 2000.

- GlaxoSmithKline (GSK), Medicines for the developing world, <http://www.gsk.com/responsibility/cr-report-2010/access-to-medicines/research-and-development/pipeline-update.htm>, acessado em 22/11/2011.
- Guido, R. V. C. *Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi: biologia estrutural e química medicinal*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2008.
- Gund, P.; Maggiora, G.; Synder, J.P. Computer-assisted drug discovery. In: Cohen, N.C. (Ed.) *Guidebook on molecular modeling in drug design*. London: Academic Press, 1996. p.219-233.
- Haag R.; Kratz, F. Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angewandte Chemie International Edition*, v.45, p.1198-1215, 2006.
- Han, H.K.; Amidon, G.L. Targeted prodrug design to optimize drug delivery. *AAPS Pharmaceutical Science*, v.2., p.E6, 2000.
- Hans, M.L.; Maxwell, C.; Ehrlichman, R.S.; Metzger, K.; Liang, Y.; Siegel, S.J.; Lowman, A.M. Evaluation of In Vitro Release and In Vivo Efficacy of mPEG-PLA-Haloperidol Conjugate Micelle-Like Structures Meredith L. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v.83B, p.422–430, 2007.
- Harada, M.; Bobe, I.; Saito, H.; Shibata, N.; Tanaka, R.; Hayashi, T.; Kato, Y. Improved anti-tumor activity of stabilized anthracycline polymeric micelle formulation, *Cancer Science*, v.102, p.192-199, 2011.
- Henckel, J.G.; Billings, E.M. Molecular modeling. In: Foye, W.O.; Lemke, T.L.; Williamns, D.A. (Eds.). *Principles of medicinal chemistry*. 4th. ed., Media: Williams & Wilkins, 1995. p.57-58.
- Hsiao, C.H.C.; Ueno, N.; Shao, J.Q.; Schroeder, K.R.; Moore, K.C.; Donelson, J.E.; Wilson, M.E. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of Leishmania. *Microbes and Infection*, p.1e12, 2011.
- Huttunen, K.M.; Raunio, H.; Rautio, J. Prodrugs—from Serendipity to Rational Design, *Pharmacological Reviews*, v.63, p.750–771, 2011
- Kahn, S.; Wleklinski, M.; Aruffo, A.; Farr, A.; Coder, D.; Kahn, M. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *Journal of Experimental Medicine*, v.182, p.1243-1258, 1995.

- Khadem, H.S. Reactions of monosacharides. In Khadem, H.S. Ed. *Carbohydrate chemistry monosaccharides and their oligomers*. 1st ed., London: Academic Press, 1988. p.101.
- Kartha, K. P. R.; Field, R. A. Iodine: A Versatile Reagent in Carbohydrate Chemistry IV. Per-O-acetylation, Regioselective Acylation and Acetolysis. *Tetrahedron*, v.53, p.11753-11766, 1997.
- Kubo, I.; Muroi, H.; Himejima, M.; Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 41, p.1016-1019, 1993.
- Kubo, I.; Kinst-Hori, I.; Yokokawa, Y.; Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. *Journal of Natural Products*, v.57, p.545, 1994.
- Krantz, M.Z.; Hotzhman, N.A.; Stowells, C.P.; Lee, Y.C. Attachment of thioglycosides to proteins: enhancement of liver membrane binding. *Biochemistry*, v.15, p.3962-3968, 1976.
- Larabi, M.; Yardley, V.; Loiseau, P.M.; Appel, M.; Legrand, P.; Gulik, A.; Bories, C.; Croft, S.L.; Barratt, G. Toxicity and antileishmanial activity of a new stable lipid suspension of amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.47, p.3774–3779, 2003.
- Lee, Y.C.; Stowell, C.P.; Krantz, M.J. 2- Imino- 2-methoxyethyl 1 thioglycosides: new reagents for attaching sugars to proteins. *Biochemistry*, v.15, p.3956-3963, 1976.
- Lee, S.J.; Zheng, N.Y.; Clavijo, M.; Nussenzweig, M.C. Normal host defence during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infection and Immunity*, v.71, 437–445, 2003.
- Li, A.C.; Glass, C.K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature Medicine*, v.8, p.1235-1242, 2002.
- Loewe, L. Global computing for bioinformatics. *Briefing Bioinformation.*, v.3, p.377-388, 2002.
- Lucas, E.F.; Soares, B.G.; Monteiro, E. *Caracterização de polímeros*: Determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E- Papers, 2001.p.89-110.

- Ikehara, Y.; Kojima, N. Development of a novel oligomannose-coated liposome-based anticancer drug-delivery system for intraperitoneal cancer. *Current Opinion in Molecular Therapeutics.*, v.9, p.53-61, 2007.
- Itokawa, H.; Morris-Natschke, S.L.; Akiyama, T.; Lee, K.H. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *Nature Medicine*, v.62, p.263-280, 2008.
- Jain. S.; Vyas, S.P. Mannosylated niosomes as carrier adjuvant system for topical immunization. *Pharmacy and Pharmacology*, v.57, p.1177-84, 2005.
- Jagiello, J. Z. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. *Acta Biochimica Polonica*, v.53, p.257–268, 2006.
- Martinez-Pomares, L.; Mahoney, J.A.; Kaposzta, R.; Linehan, S.A.; Stahl, P.D.; Gordon, S. A functional soluble form of the murine mannose receptor is produced by macrophages in vitro and is present in mouse serum. *Journal of Biological Chemistr.*, v.273, p.23376–23380, 1998
- Martinez-Pomares, L.; Reid, D.M.; Brown, G.D.; Taylor, P.R.; Stillion, R.J.; Linehan, S.A.; Zamze, S.; Gordon, S.; Wong, S.Y. Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *Journal of Leukocyte Biology*, v.73, p.604–613, 2003.
- Martinez-Pomares, L.; Wienke, D.; Stillion, R.; McKenzie, E.J.; Arnold, J.N.; Harris, J.; McGreal, E.; Sim, R.B.; Isacke, C.M.; Gordon, S. Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor. *European Journal of Immunology*, v.36, p.1074–1082, 2006.
- Martins, S.M.; Torres, C.R.; Ferreira, S.T. Inhibition of the ecto-ATP diphosphohydrolase of *Schistosoma mansoni* by thapsigargin. *Bioscience Reports*, v.20, p.369-381, 2000.
- McConville, M.J.; de Souza, D.; Saunders, E.; Likic, V.A.; Naderer, T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends in Parasitology*, v.23, p.368–375, 2007.
- Medda, S.; Jaisankar, P.; Manna, R.K.; Pal, B.; Giri, V.S.; Basu, M.K. Phospholipid microspheres: a novel delivery mode for targeting antileishmanial agent in experimental leishmaniasis. *Journal of Drug Targeting*, v.11, p.123-128, 2003.

- Miller, J.L.; Dewet, B.J.; Martinez-Pomares, L.; Radcliffe, C.M.; Dwek, R.A.; Rudd, P.M.; Gordon, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathogeny*, v.4, e17, 2008.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica, 6.^{ed.}, Brasília, 816p., 2005.
- Mitchell, S.A.; Pratt, M.R.; Hruby, V.J.; Polt, R. Solid- phase synthesis of O- linked glycopeptides analogues of enkephalin. *Journal of Organic Chemistry*, v.66, p.2327-2342, 2001.
- Moghimi, S.M.; Hunter, A.C.; Murray, J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological Reviews*, v.53, p.283–318, 2001.
- Morais, M., Subramanian, S., Pandey, U., Samuel, G., Venkatesh, M., Martins, M., Pereira, S., Correia, J.D.G., Santos, I. Mannosylated dextran labeled derivatives with fac-[M(CO)3]⁺ (M=^{99m}Tc, Re) for specific targeting of sentinel lymph node. *Molecular Pharmaceutics*, v.8, p.609-620, 2011.
- Murphy, J.E.; Tedbury, P.R.; Homer-Vanniasinkam, S.; Walker, J.H.; Ponnambalam, S. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis*, v.182, p.1–15, 2005.
- Naderer, T.; Vince, J.E.; McConville, M.J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Current Molecular Medicine*, v.4, p.649-665, 2004.
- 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.
- Namba, A.M.; Silva, V.B.; Silva, C.H.T.P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, v.33, p.13-24, 2008.
- Napper, C.E.; Drickamer, K.; Taylor, M.E. Collagen binding by the mannose receptor mediated through the fibronectin type II domain. *Biochemistry Journal*, v.395, p.579–586, 2006.

- Ness, R.K.; Fletcher, Jr.H.G.; Hudson, C.S. The reaction of 2, 3, 4, 6- tetrabenzoyl – α -D- glucopyranosyl bromide and 2,3,4,6–tetra- benzoyl– α -D-mannopyranosyl bromide with methanol. Certain benzoylated derivatives of D- glucose and D- mannose. *Journal of the American Chemical Society*, v.72, p.2200-2205, 1950.
- Nguyen, D.G.; Hildreth, J.E. Involvement of macro- phage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *European Journal of Immunology*, v.33, p.483–493, 2003.
- Ni, J.; Song, H.; Wang, Y.; Stamatou, N.M.; Wang, L.X. Toward a carbohydrate-based HIV-1 vaccine: synthesis and immunological studies of oligomannose-containing glycoconjugates. *Bioconjugate Chemistry*, v.17, p.493-500, 2006.
- Nishikawa, M.; Kamijo, A.; Fujita, T.; Takakura, Y.; Sezaki, H.; Hashida, M. Synthesis and pharmacokinetics of a new liver- specific carrier, glycosilated carboxymethyl dextran and its applications to drug targeting. *Pharmaceutical Research*, v.10, p.1253-1261, 1993.
- Oerlemans, C.; Bult, W.; Bos, M.; Storm, G.; Nijssen, J.F.W; Hennink, W.E. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharmaceutical Research*, v.27, p.2569–2589, 2010.
- Oh, K.T.; Lee, E.S.; Kim, D.; Bae, Y.H. Histidine-based pH-sensitive anticancer drug carrier micelle: Reconstitution and brief evaluation of its systemic toxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, v.24, p.177-183, 2008.
- Olliaro, P.L.; Guerin, P.J.; Gerstl, S.; Haaskjold, A.A.; Rottingen, J.A.; Sundar, S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980–2004. *The Lancet Infectious Diseases*, v.5, p.763–774, 2005.
- Orloff, J.J.; Stanski, D. Innovative approaches to clinical development and trial design. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, v.47, p.8-13, 2011.??
- Osanya, A.; Song, E.H.; Metz, K.; Shimak, R.M.; Boggiatto, P.M.; Huffman, E.; Johnson, C.; Hostetter, J.M.; Pohl, N.L.B.; Petersen, C.A. Pathogen-Derived Oligosaccharides Improve Innate Immune Response to Intracellular Parasite Infection, *American Journal of Pathology*, v.179, p. 1329–1337, 2011.

- Pal, S.; Ravindran, R.; Ali, N. Combination therapy using sodium antimony gluconate in stearylamine-bearing liposomes against established and chronic *Leishmania donovani* infection in BALB/ c mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, p.3591–3593, 2004.
- Paramashivappa, R.; Kumar, P.P.; Vithayathil, P.J.; Rao, A.S.; Novel method for isolation of major phenolic constituents from Cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.2548, 2001.
- Parveen, S.; Misra, R.; Sahoo, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine*, 2011, em impressão.
- Pereira, J.M.; Severino, R.P.; Vieira, P.C.; Fernandes, J.B.; Silva, M.F.G.F.; Zottis, A.; Andricopulo, A.D.; Oliva, G.; Corrêa, A.G. Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.16, p.8889–8895, 2008.
- Pérez-Victoria, F.J.; Sánchez-Canete, M.P.; Seifert, K.; Croft, S.L.; Sundar, S.; Castanys, S.; Gamarro, F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use. *Drug Resistance Updates*, v.9, p.26–39, 2006.
- Picman, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.14, p.255, 1986.
- Plüddemann, A.; Neyen, C.; Gordon, S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods*, v.43, p.207–217, 2007.
- Prithiviraj, B.; Manickam, M.; Singh, U.P.; Ray, A.B.; Antifungal activity of anacardic acid, a naturally occurring derivative of salicylic acid. *Canadian Journal of Botany*, v.75, p.207, 1997.
- Rangel-Yagui, C.O.; Pessoa-Jr, A.; Tavares, L.C. Micellar solubilization of drugs. *Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, p.147-163, v.8, 2005.
- Rassi, A.J.; Rassi A.; Rassi, S.G. Predictors of mortality in chronic Chagas disease: a systematic review of observational studies. *Circulation*, v.115, p.1101-1108, 2007.
- 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.

- Rebizak *et al.*, 1997; Rebizack, R.; Schaefer, M.; Dellacherie, E. Polymeric conjugates of Gd^{3+} - diethylenetriaminepentaacetic acid and dextran. Synthesis, characterization and paramagnetic properties. *Bioconjugate Chemistry*, v.8, p.605-610, 1997.
- Renslo, A.R.; McKerrow, J.H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. *Nature Chemical Biology*, v.2, p.701-710, 2006. Sant'Anna, C.M.R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos. (recomendações da iupac para 1997). *Química Nova*, v.25, p.505-512, 2002.
- Santos, D.O.; Coutinho, C.E.R.; Madeira, M.F.; Bottino, C.G.; Vieira, R.T.; Nascimento, S.B.; Bernardino, A.; Bourguignon, S.C.; Corte-Real, S.; Pinho, R.; Rodrigues, C.; Castro, H. Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. *Parasitology Research*, v.103, p.1-10, 2008.
- Sawant, R.M.; Hurley, J.P.; Salmaso, S.; Kale, A.; Tolcheva, E.; Levchenko, T.S.; Torchilin, V.P. "SMART" drug delivery systems: double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers. *Bioconjugate Chemistry*, v.17, p.943-949, 2006.
- Secretaria de Vigilância da Saúde, Leishmaniose visceral: Normas e condutas, 2006: portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lv_grave_nc.pdf, acessado em 15/04/2008.
- Sheehan, J.C.; Hess, G.P. A new method of forming peptide bonds. *Journal of the American Chemical Society*, v.77, p.1067-1068, 1955.
- Schmidt, T.J.; Brun, R.; Willuhn, G.; Khalid, S.A. Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. *Planta Medica*, v.68, p.750-751, 2002.
- Schofield, C.J.; Jannin, J.; Salvatella, R. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*, v.22, p.583-588, 2006. Silva, M.; Lara, A.S.; Leite, C.Q.F.; Ferreira, E.I.; Potential Tuberculostatic Agents: Micelle-Forming Copolymer Poly(ethylene glycol)-Poly(aspartic acid) Prodrug with Isoniazid. *Archive Pharmacy Pharmaceutical Medicinal Chemistry*, v.334, p.189-193, 2001.
- 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, M.; Ricelli, N.L.; Seoud, O.E.; Valentim, C.S.; Ferreira, A.G.; Sato, D.N.; Leite, C.Q.F.; Ferreira, E.I. Potential Tuberculostatic Agent: Micelle-forming Pyrazinamide

- Prodrug. *Archives of Pharmacy Pharmaceutical & Medicinal Chemistry*, v.339, p.283 – 290, 2006.
- Singh, S.; Malik, B.K.; Sharma, D.K. Molecular drug targets and structure based drug design: a holistic approach. *Bioinformation*, v.1, p.314-320, 2006.
- Singh, S.; Sivakumar, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection Chemotherapy*, v.10, p.307-315, 2004.
- Soares-Bezerra, R.J.; Leon, L.; Genestra, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.40, p.139-149, 2004.
- Spath, G.F.; Garraway, L.A.; Turco, S.J.; Beverley, S.M. The role of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.*, v.100, p.9536-9541, 2003.
- Stella, V.J. Prodrugs: Some Thoughts and Current Issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.99, p.4755-4765, 2010.
- Sullivan, J.T.; Richards, C.S.; Lloyd, H.A.; Krishna, G.; Anacardic Acid: molluscicide in cashew nut shell liquid. *Planta Medica*, v.44, p.175-177, 1982.
- Sülsen, V.; Gutierrez-Yappu, D.; Laurella, L.; Anesini, C.; Gimenez-Turba, A.; Martino, V.; Muschietti, L. *In Vitro* Antiplasmodial Activity of Sesquiterpene Lactones from *Ambrosia tenuifolia*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v.2011, p.1-4, 2011.
- Sun, Y.X.; Zhang, X.Z.; Cheng, H.; Cheng, S.X.; Zhuo, R.X. A low- toxic and efficient gene vector: carboxymethyl dextran- graf- polyethylenimine. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 84A, p.1102-1110, 2007.
- Sundar, S.; Jha T.K.; Thakur, C.P.; Sinha, P.K.; Bhattacharya, S.K. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *New England Journal of Medicine*, v.356, p.2571-2581, 2007.
- Swain, S.D.; Lee, S.J.; Nussenzweig, M.C.; Harmsen, A.G. Absence of the macrophage mannose receptor in mice does not increase susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection *in vivo*. *Infection and Immunity*, v.71, p.6213–6221, 2003.

- Taboureau, O.; Jorgensen, F.S. In silico predictions of hERG channel blockers in drug discovery: from ligand-based and target-based approaches to systems chemical biology. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v.14, p.375-87, 2011.
- Tailleux, L.; Maeda, N.; Nigou, J.; Gicquel, B.; Neyrolles, O. How is the phagocyte lectin keyboard played? Master class lesson by *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in Microbiology*, v.11, p.259–263, 2003.
- Talevi, A.; Goodarzi, M.; Ortiz, E.V.; Duchowicz, P.R.; Bellera, C.L.; Pesce, G.; Castro, E.A.; Bruno-Blanch, L.E. Prediction of drug intestinal absorption by new linear and non-linear QSPR. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.46, p.218-228, 2011.
- Tanowitz, H.B.; Weiss, L.M.; Montgomery, S.P. Chagas disease has now gone global. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v.5, p.e1136, 2011.
- Taylor, P.R.; Gordon, S.; Martinez-Pomares, L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends in Immunology*, v.26, 104–110, 2005.
- Texeira, R. 2002. Amebicidas, tricomonicidas, giardicidas, tripanosomicidas, leishmanicidas. In: Silva, P. (Ed.) *Farmacologia*. 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002, p.1141-1148.
- Tiuman, T.S.; Santos, A.O.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B.P.D.; Nakamura, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, v.15, p. e525–e532, 2011.
- Torchilin, V.P. Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v.73, p.137 –172, 2001.
- Torchilin, V.P. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical Research*, v.24, p.1-16, 2007.
- Torchilin, V.P. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.71, p.431-444, 2009.
- Trossini, G.H.; Malvezzi, A.; T-do Amaral, A.; Rangel-Yagui, C.O.; Izidoro, M.A.; Cezari, M.H.; Juliano, L.; Chin, C.M.; Menezes, C.M. Ferreira, E.I. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in

- Trypanosoma cruzi*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v.25, p.62-67, 2009.
- Trossini, G.H.; Giarolla, J.; Rezende, L.; Amaral, A.T.; Zaim, M.H.; Bruns, R.E.; Ferreira, E.I. Synthesis optimization of hydroxymethylnitrofurazone an antichagasic candidate, using 3^2 factorial design. *Letters in Organic Chemistry*, p.191-195, 2010.
- Uchiyama, N. Antichagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Health Science*, v.55, p.31-39, 2009.
- Urbina, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica*, v.115, p.55-68, 2010.
- Vyas, S.P.; Goyal, A.K.; Khatri, K. Mannosylated Liposomes for Targeted Vaccines Delivery. *Liposomes, Methods in Molecular Biology*, vol. 605, 177-188, 2010.
- Xie, Z.; Lu, T.; Chen, X.; Zheng, Y.; Jing, X. Synthesis, self-assembly in water, and cytotoxicity of MPEG-block-PLLA/DX conjugates. *Journal of Biomedical Materials Research A*, v.88, p.238-245, 2008.
- Xu, C.; Mager, D.E. Quantitative structure-pharmacokinetic relationships. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, v.7, p.63-77, 2011.
- Wagner, K.; Kautz, A.; Röder, M.; Schwalbe, M.; Pachmann, K.; Clement, J.H.; Schnabelrauch, M. Synthesis of oligonucleotide- functionalized magnetic nanoparticles and study on their in vitro cell uptake. *Applied Organometallic Chemistry*, v.18, p.514-519, 2004.
- Wainszelbaum, M.J.; Proctor, B.M.; Pontow, S.E.; Stahl, P.D.; Barbieri, M.A. IL4/PGE2 induction of an enlarged early endosomal compartment in mouse macro- phages is Rab5-dependent. *Experimental Cell Research*, v.312, p.2238–2251, 2006.
- Wanasen N.; MacLeod, C.L.; Ellies, L.G.; Soong, L. 1-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infection and Immunity*, v.75, p.2802-2810, 2007.
- Wang, Z.D.; Martin, M.; Scheikh, S. Facile preparation of peracetates and per-3-bromobenzoates of α -mono- and disaccharides. *Molecules*, v.10, p.1325-1334, 2005.
- Wermuth, C.G. Designing prodrugs and bioprecursores. In: Wooldridge, K.R.H.; Jolles, G. Eds. *Drug Design: fact or fantasy?* London: Academic Press, 1984. p. 47-72.

- Wermuth, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: Wermuth, C.G, Ed. *The practice of medicinal chemistry*. 2 ed., London: Academic Press, 2008. p.571-586.
- Werner, A.B.; Heitmann, I.G.; Jercic, M.I.L.; Jofré, L.M.; Muñoz, P.C.V.; Noemí, I.H.; Martín, A.M.S.V.; Sapunar, J.P.; Torres, M.H.; Zulantay, I. A. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas 2006: Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Revista Chilena de Infectología*, v.25, p. 384-389, 2008.
- World Health Organization (WHO), Chagas disease: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/default.htm>, acessado em 16/06/2008a.
- World Health Organization (WHO), Chagas disease: <http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/pr13/chagas.pdf>, acessado em 16/06/2008b.
- World Health Organization (WHO), Leishmaniasis, the disease and its epidemiology: http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html, acessado em 13/04/2008c.
- World Health Organization (WHO), Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf, acessado em 10/09/2011d.
- World Health Organization (WHO). Leishmaniasis, magnitude of the problem: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.htm, acessado em 13/04/2008d.
- Wright, M. M.; Howe, A. G.; Zaremborg, V. Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.82, p.18-26, 2004.

APÊNDICE I

APÊNDICE I

1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS

1.1 INTRODUÇÃO SOBRE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (Lucas *et al.*, 2001)

Os métodos ópticos utilizados para caracterização de polímeros podem ser classificados em espectroscópicos e não espectroscópicos. Os primeiros baseiam-se na medida da intensidade e do comprimento de onda de uma energia radiante e no espectro produzido pelas transições entre os estados de energia característicos. Já os métodos não espectroscópicos baseiam-se nas interações entre a radiação eletromagnética e a matéria. Isso resulta em mudança na direção ou propriedade física da radiação. Os mecanismos específicos dos métodos não espectroscópicos podem ser divididos em refração, reflexão, espalhamento, difração, dispersão, polarização e dicroísmo.

Dentre os métodos não espectroscópicos, o espalhamento de luz é um dos mais utilizados na caracterização de polímeros. Esta técnica pode fornecer informações sobre a massa molecular ponderal média, magnitude da interação polímero-solvente e tamanho médio das cadeias.

Segundo o princípio teórico desta técnica, um meio completamente homogêneo não é capaz de espalhar a luz. No caso de um meio não homogêneo, a luz é espalhada em todas as direções. Soluções de macromoléculas são consideradas como meio não homogêneo. A mobilidade aleatória e difusa das macromoléculas provoca a formação de áreas de diferentes concentrações. Estas áreas possuem diferentes constantes dielétricas e, portanto diferentes índices de refração em relação ao fluido como um todo. São estas áreas que funcionam como centros de espalhamento de luz. Quanto maior for o tamanho destes centros, maior será a assimetria na distribuição das intensidades de luz em torno destes centros.

A teoria de espalhamento de luz foi inicialmente proposta em 1871, por Lord Rayleigh, que aplicou a teoria eletromagnética clássica para explicar o fenômeno de espalhamento de luz por moléculas de gases. Ele demonstrou que as partículas dispersas em um meio qualquer atuam como fontes de luz, cuja intensidade por

unidade de volume do material espalhante é I_0 , quando observada a uma distância d e um ângulo θ em relação ao feixe incidente. O método consiste, então, na medida da intensidade da luz espalhada ao passar por uma solução diluída de polímero.

Quando uma radiação eletromagnética encontra uma partícula situada no seu caminho de propagação, ela interage com esta partícula, induzindo oscilações nas nuvens eletrônicas da matéria. Estas oscilações geram dipolos onde os elétrons da partícula se alinham em um plano de campo eletromagnético. A intensidade do dipolo induzido pela interação é proporcional ao campo elétrico da radiação incidente. A constante de proporcionalidade é conhecida como polarizabilidade, α , da molécula.

A técnica de espalhamento de luz pode ser de dois tipos: estático e dinâmico. No primeiro, escolhe-se um volume de espalhamento grande e um tempo de registro longo. Nessas circunstâncias todas as flutuações resultantes do movimento das moléculas são lidas como média. Já a segunda considera o movimento de moléculas em solução. Este movimento molecular causa flutuações de concentração em função do tempo. Neste caso, a intensidade de espalhamento (em curtos intervalos de tempo) é registrada com uma função do tempo e flutuações nessa intensidade de espalhamento são observadas como consequência das flutuações de concentração no volume de espalhamento.

1.1. MATERIAL E MÉTODOS

A determinação do tamanho médio e da massa molecular média dos polímeros dextrano, carboximetildextrano, carboximetildextrano-manose e carboximetildextrano-manose-mexicanina foi realizada por espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering*, DLS) no laboratório do Prof. Omar A. El Seoud, com auxílio do técnico Dr. Paulo Augusto Rodrigues Pires, do Instituto de Química da USP. Os ensaios foram realizados em Sistema Malvern 4700 Espalhamento de Luz operando com laser Ar^+ a 488 nm e o método Contin foi o que melhor se ajustou à análise.

No caso do dextrano, a determinação da massa molecular média foi realizada também por osmolaridade no laboratório do Prof. Pedro de Alcântara Pessoa Filho, da Engenharia Química da USP. As análises foram realizadas em Osmômetro 4420 colloid osmometer, neste foram medidas as pressões osmóticas de diferentes concentrações do polímero em água.

Para cada ensaio de espalhamento por luz dinâmica, as amostras foram pesadas (0,100 g do dextrano, carboximetildextrano e carboximetildextrano ligado à manose e 0,015 g do carboximetildextrano ligado à manose e mexicanina) e, em seguida, solubilizadas em 10 mL de solução aquosa de cloreto de sódio 0,1 M e filtradas.

Para o ensaio de osmolaridade, soluções do dextrano a 0,0125; 0,025; 0,0375 e 0,050% (m/m) em água foram preparadas e medidas.

1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise do material de partida, o dextrano, por espalhamento de luz dinâmico, este apresentou pico médio de 18,3 nm, com largura de 34,5 nm na distribuição do tamanho das partículas (Figura Ala). A massa molecular média foi de $0,2 \times 10^6$ g/mol (Figura Alb). O valor médio encontrado foi maior que a massa molecular descrita pelo fabricante (70.000 g/mol).

Figura Ala: Distribuição do tamanho das partículas do dextrano.

Figura Alb: Distribuição do massa molecular do carboximetildextrano.

O valor da massa molecular média calculado para o dextrano por osmolaridade foi de 40.000 g/mol (Figura Alc). Este valor foi bem menor que o obtido por ensaio de espalhamento de luz dinâmico e mais próximo do valor descrito pelo fabricante. É possível que o valor elevado da massa molecular do dextrano, encontrada no ensaio de espalhamento, seja devido à maior concentração da amostra utilizada durante esse experimento, quando comparado com a medida por osmolaridade, nas quais se utilizaram concentrações mais diluídas do polissacarídeo.

Figura Alc: distribuição da massa molecular média do dextrano por osmolaridade.

O carboximetildextrano apresentou pico médio de 533,4 nm, com largura de 1.593,3 nm na distribuição do tamanho das partículas (Figura Ald). A massa molecular média foi de $77,4 \times 10^6$ g/mol (Figura Ale). Este valor foi muito superior à massa molecular média do polímero dextrano. É possível que esta diferença seja devido à alta concentração da amostra ou a interações entre as unidades poliméricas.

Figura Ald: Distribuição do tamanho das partículas do carboximetildextrano.

Figura Ale: Distribuição da massa molecular do carboximetildextrano.

O carboximetildextrano ligado à manose apresentou dois picos médios: um de 14,5 nm com largura de 26,9 nm e outro a 514,4 nm com largura de 687,2 nm na distribuição do tamanho das partículas (Figura Alf). A massa molecular média apresentada nos dois grupos foi de $0,2 \times 10^6$ e $72,8 \times 10^6$ g/mol, respectivamente (Figura Alg). Da mesma forma que para o CMD, é possível que estes grupos tenham se formado devido à alta concentração da amostra ou interação entre as unidades poliméricas. Além disso, considerando a alta polidispersão do polímero, este resultado pode indicar que a manose possa ter reagido com cadeias de carboximetildextrano mais curtas, formando dois grupos com massas moleculares diferentes.

Figura Alf: Distribuição do tamanho das partículas do carboximetildextrano ligado à manose.

Figura Alg: Distribuição da massa molecular do carboximetildextrano ligado à manose.

A amostra carboximetildextrano–manose-mexicanina apresentou dois picos médios: um a 26,4 nm com largura de 35,6 nm e outro a 355,4 nm com largura de 546,1 nm na distribuição do tamanho das partículas (Figura Alh). A massa molecular média das respectivas distribuições de tamanho são $0,5 \times 10^6$ g/mol e $39,3 \times 10^6$ g/mol (Figura Ali). Da mesma forma que os demais intermediários, os valores elevados obtidos para massa molecular média poderiam estar relacionados com a concentração da amostra e interação entre as unidades poliméricas.

Figura Alh: Distribuição do tamanho das partículas do carboximetildextrano – manose – mexicanina.

Figura Ali: Distribuição da massa molecular do carboximetildextrano – manose – mexicanina.

Essas análises deverão ser refeitas em outras condições, para que se possa chegar a melhores resultados.

APÊNDICE II

APÊNDICE II

1 FORMAÇÃO DE SISTEMAS MICELARES PRELIMINARES POR MODELAGEM MOLECULAR

1.1. MATERIAL E MÉTODOS

O confômero de Mon1 de menor energia selecionado da dinâmica de 500 ps a 300 K foi utilizado na formação de sistemas micelares preliminares contendo de 2 a 20 unidades monoméricas. Para cada adição de monômero, o sistema foi minimizado em campo de força MM⁺. Cargas atômicas parciais foram calculadas por método semempírico AM1, seguido de dinâmica curta de relaxamento de 50 ps a 300 K (Hyperchem 7.51). A energia potencial total (E_{tot}) e suas respectivas contribuições de energia foram calculadas no programa MOLSIM 3.2.

1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De maneira a complementar estes estudos, os confômeros de menor energia mínima selecionados servirão de *input* para a simulação de agregados com mais de uma unidade monomérica. Cálculos para Mon1 já foram realizados e encontram-se em análise e os cálculos para Mon2 já foram iniciados.

Nesta etapa, os valores de E_{TOT} para Mon1 correspondem à soma de todas as contribuições de energia mostradas na Tabela AII. De acordo com estes valores é possível verificar que os valores de E_{TOT} e ΔH dividem-se em quatro grupos considerando a adição de unidades monoméricas: (1) de 2 a 3 unidades, (2) de 4 a 11 unidades, (3) de 12 a 16 unidades e (4) de 17 a 20 unidades (Tabela AII).

Tabela All: Contribuições das energias geradas após adição de cada unidade monomérica (2 a 20) de Mon1 e valores de E_{TOT} .

MON	Energia (kcal/mol)											N°_LH	ΔH
	EST	ANG	TOR	INTER VDW	INTRA VDW	LIG_H	LJ	INTER ELE	INTRA ELE	SOLV	TOT		
2	10,95	76,79	67,80	-15,57	-53,52	-244,70	-6,21	12,65	288,82	-15,03	121,99	0	264,01
3	18,74	115,19	59,16	-66,27	-87,48	-487,47	-7,25	1,76	502,74	-12,82	36,30	4	302,04
4	902,51	388,46	200,85	416,69	425,18	-1024,25	-13,42	-2,01	1007,52	-13,49	2288,04	35	3026,59
5	1671,35	300,60	209,27	738,05	732,17	-1109,36	-6,31	-13,50	1125,11	-28,08	3619,30	21	3617,25
6	1742,17	532,75	230,04	771,14	792,37	-1560,93	-12,63	-24,91	1535,68	-31,21	3974,47	45	3983,67
7	1680,8	376,48	203,34	679,97	665,59	-1462,83	-12,89	-14,57	1479,49	-34,7	3560,68	31	3702,16
8	1685,14	371,56	232,54	635,81	607,33	-1694,26	-23,04	-43,56	1681,26	-34,04	3418,74	29	3829,9
9	1685,33	464,74	257,67	568,12	562,53	-2074,67	-22,22	-41,91	2072,37	-29,33	3442,63	40	3860,33
10	1969,06	610,34	268,59	772,06	758,83	-2005,46	-27,96	-23,84	2025,13	-42,3	4304,45	34	3732,74
11	1975,64	648,72	304,42	711,53	695,07	-2381,63	-42,05	-15,61	2439,87	-41,84	4294,12	52	3802,86

MON: número de unidades monoméricas adicionadas, EST: energia de estitamento, ANG: energia angular, TOR: energia torsional, INTER VDW:

energia intermolecular de van der waals, INTRA VDW: energia intramolecular de van der waals, LIG_H: ligação de hidrogênio, INTER ELE:

energia intermolecular eletrostática, INTRA ELE: energia intramolecular eletrostática, SOLV: energia de solvatação, TOT: energia total, N°_LH:

número de ligações de hidrogênio, ΔH : entalpia

Tabela AII: Contribuições das energias geradas após adição de cada unidade monomérica (2 a 20) de Mon1 e valores de E_{TOT} (continuação)

MON	Energia (kcal/mol)										TOT	N°_LH	ΔH
	EST	ANG	TOR	INTER VDW	INTRA VDW	LIG_H	LJ	INTER ELE	INTRA ELE	SOLV			
12	3123,15	719,64	351,87	1170,72	1119,11	-2538,87	-29,67	-27,56	2585,63	-48,37	6425,65	45	5379,05
13	3550,17	878,43	300,9	1307,27	1296,63	-2848,69	-23,95	6,22	2902,56	-63,48	7306,06	31	6615,10
14	3129,25	765,25	391,81	1103,47	1037,57	-3067,89	-38,09	-43,16	3110,14	-67,21	6321,14	14	5542,23
15	3133,14	797,85	395,96	1065,65	1003,2	-3410,61	-42,78	-7,87	3487,18	-67,59	6354,13	23	5623,43
16	4515,35	869,67	368,56	1548,25	1518,01	-3281,3	-22,89	-44,96	3320,99	-66,23	8725,45	25	7246,90
17	7101,16	1335,16	599,86	3061,57	3053,58	-4248,74	-41,18	-3,44	4273,86	-55,74	15076,09	47	10369,70
18	7858,93	1121,73	524,57	3350,99	3264,2	-4089,69	-74,21	1,23	4175	-69,28	16063,47	30	11056,03
19	7860,58	1125,95	562,44	3297,76	3215,78	-4345,67	-73,91	-49	4389,91	-55,28	15928,56	36	11125,10
20	8440,42	1261,56	645,99	365,5	3553,66	-4625,21	-69,35	-48,87	4670,37	-67,7	17413,37	37	11915,50

MON: número de unidades monoméricas adicionadas, EST: energia de estitamento, ANG: energia angular, TOR: energia torsional, INTER VDW: energia intermolecular de van der waals, INTRA VDW: energia intramolecular de van der waals, LIG_H: ligação de hidrogênio, INTER ELE: energia intermolecular eletrostática, INTRA ELE: energia intramolecular eletrostática, SOLV: energia de solvatação, TOT: energia total, N°_LH: número de ligações de hidrogênio, ΔH : entalpia

As contribuições de energia responsáveis pelo aumento e diferenças nos valores de E_{TOT} foram, principalmente, referentes às energias de estiramento e angular, provavelmente devido ao maior impedimento estérico e consequente diminuição do grau de liberdade resultante da adição de cada unidade monomérica. As energias eletrostáticas e de van der Waals também contribuíram para o aumento dos valores de E_{TOT} , possivelmente devido à maior proximidade entre as unidades, em razão da adição de cada monômero.

O número de ligações de hidrogênio não apresentou o padrão esperado de aumento com cada acréscimo de unidade monomérica, provavelmente devido à desordem do sistema e não alinhamento das regiões polares e apolares das unidades monoméricas. O sistema com 11 unidades monoméricas apresentou o maior número de ligações de hidrogênio (52) intra e intermoleculares.

Como resultados preliminares de Mon1 é possível verificar quenas interações entre duas unidades monoméricas (2-Mon1) e os valores de E_{tot} e energia de entalpia (ΔH) foram de 121,98 kcal/mol e 264 kcal/mol, repectivamente. A contribuição das energias de van der Waals intra (-53,52 kcal/mol) e intermolecular (-15,57 kcal/mol) provavelmente foram responsáveis por este menor valor de E_{tot} . Isto poderia estar relacionado com a maior liberdade conformacional do sistema composto por apenas dois monômeros. Esta maior liberdade conformacional também pode estar relacionada com a ausência das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.

O sistema com quatro unidades monoméricas (4-Mon1) (Figura AII) apresentou o segundo menor valor de E_{tot} , além de 40 ligações de hidrogênio (intra e intermolecular). Estas últimas são responsáveis, provavelmente, pela estabilidade entre as unidades de 4-Mon1 (energia da ligação de hidrogênio contribui com -1.024,51 kcal/mol). Além disso, a contribuição da energia de solvatação para o baixo valor de E_{tot} foi de -134,90 kcal/mol, aproximadamente 114 kcal/mol inferior ao valor encontrado para a mesma contribuição em 3-Mon1. As contribuições de energia intra e intermoleculares de van der Waals, bem como interações Leonard-Jones ou, tipo 1-4, também se mostraram energeticamente favoráveis ao valor de E_{tot} obtido no sistema 4-Mon1.

Figura Alla: Visualização do sistema de 4-Mon1 nos modelos palito e CPK. No modelo palito é possível visualizar as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Átomos de carbono estão em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, enxofre em laranja e hidrogênio em branco.

Os sistemas entre cinco (5-Mon1) e onze (11-Mon1) (Figura Allb) unidades monoméricas apresentaram valores de E_{tot} e ΔH entre 2288,04-4294,12 kcal/mol e 3026,59-3802,86 kcal/mol, respectivamente. Valores elevados das energias relacionadas com impedimento estérico (energia de estiramento, angular e torsional) contribuem para o aumento da E_{tot} . Valores de energia eletrostática intramolecular (entre 1007,52 e 2439,87 kcal/mol) e de van der Waals intra (entre 425,18 e 695,07 kcal/mol) e intermolecular (entre 416,69 e 711,53 kcal/mol) também se mostram altos. No entanto, baixos valores de energia de ligação de hidrogênio (de -1024,25 a -2381,63 kcal/mol), Leonard-Jones (entre -13,42 a -42,05 kcal/mol), energia eletrostática intermolecular (entre -2,01 e -43,56 kcal/mol) e energia de solvatação (entre -13,49 e -41,84 kcal/mol) contribuem favoravelmente para a E_{tot} do sistema.

Figura Allb: Modelos tridimensionais dos agregados micelares com (a) 5 e (b) 10 unidades monoméricas de Mon1.

Os sistemas de 12-Mon1 (6425,65 kcal/mol) a 20-Mon1 (17413,37 kcal/mol) (Figura 70) apresentaram os maiores valores de E_{tot} . Estes compostos apresentaram o mesmo perfil de distribuição dos valores de energia dos sistemas analisados previamente. Valores maiores para as energias de estiramento, angular e torsional são esperados uma vez que poucas moléculas compõem o sistema, o que confere maior possibilidade de mobilidade e rearranjo entre os monômeros. Da mesma forma que os demais sistemas estudados, é possível visualizar também valores mais altos para as energias eletrostática intramolecular e de van der Waals intra e intermolecular, bem como baixos valores para as energias de ligação de hidrogênio, Leonard-Jones, energia eletrostática intermolecular e energia de solvatação.

Figura Allc: Modelos tridimensionais dos agregados micelares com (a) 15 e (b) 20 unidades monoméricas de Mon1.

APÊNDICE III

APÊNDICE III

1 TENTATIVA DE LIGAÇÃO DA 3-HIDROXIFLAVONA E QUERCETINA AO DEXTRANO

* A representação dos grupos substituintes dos produtos esquematizados neste item é aleatória.

Tentativa de nova abordagem sintética foi realizada funcionalizando a 3-hidroxi-flavona e quercetina, não previstas no trabalho original, com anidrido succínico para ligá-las ao polímero dextrano não modificado. Estas apresentam, também, atividade tripanomicida e leishmanicida *in vitro*.

1.1. MÉTODOS

1.1.1. Hemissucinil-3-hidroxi-flavona

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 2 mmol de anidrido succínico e 0,1 mmol de DMAP em THF. Após 1 h adicionou-se 1 mmol de 3-hidroxi-flavona e, em seguida, 0,8 mL de piridina. A reação foi mantida por 5 h e, em seguida, a mistura reacional foi rotaevaporada.

1.1.2 Hemissuccinil-3-hidroxiavona - dextrano

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 0,12 mmol de hemissuccinil-3-hidroxiavona, 0,13 mmol de EDC ou DCC e 0,1 mmol de DMAP em DMSO. Após 1 hora sob agitação em banho de gelo acrescentou-se 0,5 mmol dextrano. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A mistura foi dializada em membrana de diálise de *cut off* de 12.000 a 14.000 Da, contra água destilada, por 72 h e, em seguida, liofilizada

1.1.3 Hemissuccinil-quercetina

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 2 mmol de anidrido succínico e 0,1 mmol de DMAP em THF. Após 1 h, adicionou-se 1 mmol de quercetina e, em seguida, 0,8 mL de piridina. A reação foi mantida por 5 h e, em seguida, a mistura reacional foi rotaevaporada.

1.1.4 Hemissuccinil-quercetina-dextrano

Em balão de fundo redondo adicionaram-se 0,12 mmol de 3-hidroxiavona – anidrido succínico, 0,13 mmol de EDC ou DCC e 0,1 mmol de DMAP em DMSO. Após 1 hora sob agitação em banho de gelo acrescentou-se 0,5 mmol dextrano. A reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. A mistura foi dializada em membrana de diálise de *cut off* de 12.000 a 14.000 Da, contra água destilada, por 72 h e, em seguida, liofilizada.

1.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.2.1. Hemissuccinil-3-hidroxiavona

Na análise do RMN ^1H (Figura AIIIa) verifica-se a presença de dubleto a 2,89 ppm, relacionado a H_2 e H_3 . Sinais entre 8,58 e 6,77 ppm referem-se aos H_4 - H_{13} da 3-hidroxiavona.

Figura AIIIa: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto hemissuccinil-3-hidroxi flavona não purificado.

1.1.2 3-Hemissuccinil-3-hidroxiavona-dextrano

O produto formou um precipitado amarelo, o qual foi filtrado e analisado separadamente. Na análise do RMN ^1H deste último (Figura AIIIb) verificou-se ausência dos sinais característicos do dextrano ($\text{H}_{12}\text{-H}_{17}$) a aproximadamente 3 ppm. Apenas os sinais entre 8,24 e 7,46 ppm referente a 3-hidroxiavona ($\text{H}_3\text{-H}_{10}$) são visualizados.

Figura AIIIb: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto precipitado hemissuccinil-e-hidroxi-flavona-dextrano não purificado.

Na análise do RMN ^1H do filtrado (Figura AIIIc) verifica-se a presença dos sinais característicos do dextrano ($\text{H}_{12}\text{-H}_{17}$) entre 3,74 e 3,22 ppm e ausência dos sinais da 3-hidroxiavona ($\text{H}_3\text{-H}_{10}$) entre 8,24 e 7,46 ppm, indicando que o produto proposto não se formou.

Figura AIIIc: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto filtrado hemissuccinil-3-hidroxi-flavona-dextrano não purificado.

1.1.3 Hemissuccinil-Quercetina

Na análise do RMN ^1H (Figura AIIId) verifica-se a presença de duplete a 2,90 ppm, relacionado a H_2 e H_3 . Sinais entre 8,58 e 6,19 ppm referem-se aos H_4 - H_{13} da quercetina.

Figura AIIId: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm) do produto hemissuccinil-quercetina não purificado.

1.1.4 Hemissuccinil-quercetina-dextrano

Na análise do espectro de RMN ^1H (Figura AIIIe), observou-se total ausência dos sinais referentes aos hidrogênios da quercetina e do dextrano.

Figura AIIIe: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) do produto –hemissuccinil-quercetina-dextrano não purificado.

ANEXO I

INSTRUÇÕES PARA BANCA

JULGADORA

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 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição 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 arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO II

ATIVIDADES ACADÊMICAS

ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS

1. PARTICIPAÇÃO EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

- ❖ **Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de novos Fármacos para Doenças Negligenciadas – USP**, que ocorreu no período de 23 a 25 de setembro de 2009, na Universidade de São Paulo.
- ❖ **2º Minicolóquio de Produtos Naturais da Biodiversidade Ativos Contra Agentes de Doenças Negligenciadas e Identificação de Alvos Moleculares**, realizado entre 04 e 06 de novembro de 2009, no Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais (IPEPATRO), em Porto Velho (RO).
- ❖ **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, que ocorreu no período de 28 a 31 de maio de 2010 em Águas de Lindóia (SP).
- ❖ **XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia e XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica** realizada entre 18 e 22 de outubro de 2010, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- ❖ **241st American Chemical Society National Meeting & Exposition**, que ocorreu entre 27 e 31 de março de 2011 em Anaheim, Califórnia.
- ❖ **II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas**, realizado entre 07 e 10 de novembro de 2011, na Universidade de São Paulo.

2. APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSOS

- ❖ Apresentação oral no 2º Minicolóquio de Produtos Naturais da Biodiversidade Ativos Contra Agentes de Doenças Negligenciadas e Identificação de Alvos Moleculares, que ocorreu entre 04 e 06 de novembro de 2009, no Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais (IPEPATRO) – Fiocruz Noroeste, em Porto Velho (RO), com o seguinte tema: **Utilização de Produtos Naturais no Planejamento de Fármacos Dirigidos Potencialmente Antichagásicos e Leishmanicidas**.
- ❖ Apresentação do pôster **Modelagem molecular na liberação de fármacos dirigidos micelares do ácido anacárdico ligado ao hidroximetilnitrofural e helenalina**, na 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, que ocorreu no período de 28 a 31 de maio de 2010 em Águas de Lindóia (SP).
- ❖ Apresentação oral e de pôster na XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia e XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica que ocorreram entre 18 e 22 de outubro de 2010, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com o seguinte tema: **Molecular modeling of micellar targeted drug systems of the anacardic acid bound to hydroxymethylnitrofural and helenalin**.

- ❖ Apresentação de pôster na 241st American Chemical Society National Meeting & Exposition, que ocorreu entre 27 e 31 de março de 2011 em Anaheim, Califórnia, com o seguinte tema: **Molecular modeling as a tool in the evaluation of a site – targeted micelle system containing anacardic acid and hydroxymethylnitrofurazone (NFOH).**
- ❖ Apresentação de pôster no II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, realizado entre 07 e 10 de novembro de 2011, na Universidade de São Paulo, com o tema **Molecular modeling as a tool in the evaluation of a site – targeted micelle system containing anacardic acid and hydroxymethylnitrofurazone (NFOH).**

3. CURSOS

- ❖ “**Aplicação da Metodologia QSAR-4D usando o programa LQTA-QSAR**”, realizado de 04 a 06 de março de 2009, com carga horária de 20h, organizado pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Quimiometria Teórica e Aplicada (LQTA), no Instituto de Química da UNICAMP.

4. OUTRAS ATIVIDADES

- ❖ **Participação em Comitê Organizador Local do Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de novos Fármacos para Doenças Negligenciadas – USP e as Redes Temáticas**, que ocorreu no período de 23 a 25 de setembro de 2009, na Universidade de São Paulo.
- ❖ **Participação em Comitê Organizador Local do II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de novos Fármacos para Doenças Negligenciadas**, realizado entre 07 e 10 de novembro de 2011, na Universidade de São Paulo.