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

Síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente
antichagásicos e leishmanicidas derivados de hidroximetilnitrofural,
3-hidroxiﬂavona e quercetina

Jeanine Giarolla

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2012

Jeanine Giarolla

Síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente
antichagásicos e leishmanicidas derivados de hidroximetilnitrofural,
3-hidroxi flavona e quercetina

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICO ESTE TRABALHO:

Primeiramente à minha família:

A minha mãe, Terezinha Zucchetti Giarolla, pelo amor, dedicação e grande incentivo aos estudos. Não teria conquistado este trabalho sem sua intensa participação em todos os momentos de minha vida, sempre com palavras encorajadoras e de apoio.

Ao meu pai, Celso Giarolla (in memoriam), que, apesar de termos convivido por pouco tempo, deixou-me um exemplo de vida, de sabedoria, de boas condutas e amor pelos estudos. Tenho certeza de que ele se orgulharia desta conquista.

Aos meus queridos irmãos Emanuel, Angélica, Gustavo, Ivelise e Lúcio Giarolla e sobrinhos Pedro Picini e Marina G.C. Campos. Apesar de estarmos separados pelas trajetórias de cada um, estão sempre presentes em meus pensamentos. Agradeço a amizade e a eterna disposição em me ajudar nos momentos mais difíceis. Vocês são o meu suporte para enfrentar as dificuldades da vida.

Ao meu esposo, Fabrício Vargas. É difícil expressar com palavras sua importância no desenvolvimento deste trabalho. Seus conselhos foram encorajadores. Seu imenso conhecimento em Química foi fundamental. Seu apoio e incentivo em todas as circunstâncias tornaram este trabalho ainda mais bonito. Esta conquista é nossa!!!

Ao Olavo Gíarolla Vargas, nosso gatinho e grande companheiro, que tornou nossas vidas ainda mais felizes!!

*A minha orientadora e “mamãe científica”,
Professora Titular Elizabeth Igne Ferreira, primeiramente
pela oportunidade de realizar um sonho da minha vida.
Saiba que a senhora é meu exemplo de como ser educadora,
filha, mãe e amiga. Eu me orgulho de seu imenso
conhecimento em Química Farmacêutica e de ter tido o
privilégio de ser sua aluna. Muito obrigada pelo apoio,
amizade e paciência. Levarei comigo seus valiosos
ensinamentos e todas as boas lembranças destes anos de
convivência.*

A Professora Dra. Maria Luíza Cruz por ter me apresentado à Química Farmacêutica e à Professora Titular Elizabeth Igne Ferreira. Sua paixão pela disciplina me contagiou. Seu exemplo de dedicação, entusiasmo e sabedoria incentivaram minha dedicação à esta área tão interessante, desafiadora e complexa. Muito obrigada por me ensinar a amar a ciência!!

AGRADECIMENTOS

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

À FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido.

Ao Professor Titular Antony D'Emanuele, por me proporcionar a grande oportunidade de meu estágio sanduíche. Seus conhecimentos serão de grande valia para minha carreira científica.

À Professora Dra. Daniela Gonçalves Rando, por me ensinar a encarar a vida com alegria e descontração. Muito obrigada pela amizade, parceria, conselhos, diversão e apoio em todos os momentos deste período.

À Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, pela ajuda e suporte nos estudos de modelagem molecular. Muito obrigada pela amizade e por me ensinar técnicas tão importantes para a minha formação acadêmica.

Ao pesquisador Dr. Márcio H. Zaím, pelo grande auxílio que muito contribuíram para meu crescimento científico e desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini, pela amizade e momentos de descontração, tão importantes para a união do grupo, deixo aqui o meu muito obrigada.

Aos Professores Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui e Dr. Roberto Parise Filho, pela amizade e sugestões que colaboraram com este trabalho.

À Dra. Claudete J. Valduga pela grande contribuição no exame de qualificação. Suas sugestões enriqueceram este trabalho.

À Maria Inês de Almeida Gonçalves, pela colaboração nas análises de RMN.

À Vanessa Almeida Otelo, amizade que se iniciou no ingresso da pós-graduação na Universidade de São Paulo e que foi de grande importância nesta conquista. Obrigada pelas palavras de incentivo, paciência e pelo seu exemplo de vida e boa conduta.

À Soraya da Silva Santos e Andressa Polidoro, família Dendrimérica, que tanto ajudaram nas sínteses dos dendrímeros. Sem palavras para agradecer toda parceria e amizade.

Às alunas de iniciações científicas Patrícia Sotelo e Janaína de Oliveira Pupo, que muito contribuíram para minha formação acadêmica e no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos de Laboratório Kátia Botelho, Kely Turra, Ricardo Serafim, Marina Prímí, Bárbara Vaz, Natanael Segretti, Hamilton Bigatão, Charles de Lima Brito e João Paulo Lemes, pela convivência e amizade.

Aos colegas do laboratório da University of Central Lancashire, pela colaboração e apoio.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Bete, David, Jorge e Elaine, pelo auxílio nos problemas burocráticos.

À toda minha família e amigos que sempre foram fonte de apoio constante, compreendendo as muitas vezes em que se fez necessária minha ausência.

MUITO OBRIGADA!

“Loucura? Sonho?

Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo teve início de outra maneira, mas tantos sonhos se realizaram que não temos o direito de duvidar de nenhum”.

Monteiro Lobato

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

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da tripanossomíase americana ou doença de Chagas. A infecção ocorre desde o sul dos EUA até o sul da Argentina e cerca de 20 milhões de pessoas da América Latina correm o risco de adquirir a doença. Já a leishmaniose é causada por aproximadamente 17 diferentes espécies de protozoários unicelulares pertencentes à família *Trypanosomatidae*. Aproximadamente 350 milhões de pessoas correm o risco de contrair a infecção e estimam-se que existam 12 milhões de pessoas infectadas. A quimioterapia para estas duas doenças negligenciadas é limitada e os fármacos disponíveis na terapêutica são tóxicos, com eficácia discutível, podem causar resistência e, ocasionalmente, a administração parenteral é necessária. Frente ao exposto, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos é necessária. À vista de tais fatos e utilizando-se o método de modificação molecular latenciação, o objetivo deste trabalho é a síntese e caracterização de pró-fármacos dendriméricos de primeira geração de hidroximetilnitrofural, 3-hidroxiflavona e quercetina. O hidroximetilnitrofural tem mostrado atividade contra as formas amastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*. Os flavonóides 3-hidroxiflavona e quercetina mostraram-se mais ativos que o padrão miltefosina em ensaios *in vitro* para leishmaniose. Já os dendrímeros são novas arquiteturas moleculares com estruturas nanoscópicas, extremamente organizadas e apresentam massa molecular definida. As aplicações incluem, por exemplo, a atuação como agentes transportadores de fármacos. Diversas metodologias sintéticas foram desenvolvidas na tentativa de se obter os pró-fármacos dendriméricos. Um das maiores dificuldades encontradas foi a purificação dos compostos sintetizados. Adicionalmente, foram realizados estudos de modelagem molecular para auxiliar a compreensão sobre a liberação das substâncias ativas da malha dendrímica. Experimentos sobre hidrólise enzimática do pró-fármaco composto por PAMAM (geração 1) e 3-hidroxiflavona também foram desenvolvidos.

GIAROLLA, J. **Synthesis of dendrimer prodrugs potentially antichagasic and antileishmanial derivatives from hydroxymethylnitrofurazone, 3-hydroxyflavone and quercetin.** 2012. 183p. Thesis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2012.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of American trypanosomiasis or Chagas' disease. The infection occurs from the southern USA to southern Argentina and about 20 million people in Latin America are at risk of acquiring the disease. Leishmaniasis is caused by approximately 17 different species of unicellular protozoa belonging to the family *Trypanosomatidae*. Approximately 350 million people are at risk of acquiring the infection and it is estimated that there are 12 million people infected. Chemotherapy for these two neglected diseases is limited and the drugs available on therapy are toxic, with uncertain efficacy, may cause resistance and, occasionally, intravenous administration is required. Based on these facts, research and development for new drugs is needed. Considering that and using the method of molecular modification prodrug design, the purpose of this work is the synthesis and characterization of first generation dendrimer prodrug of hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), quercetin and 3-hydroxyflavone. The NFOH has shown activity against amastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi*, *in vitro* and *in vivo*. The flavonoids quercetin and 3-hydroxyflavone were more active than miltefosine in *in vitro* assays for leishmaniasis. Dendrimers are new molecular architectures with nanoscopic structures, extremely organized and it has defined molecular weight. The applications include, for instance, working as drugs carriers. A range of synthetic methodologies have been developed in an attempt to synthesize the dendrimers prodrugs. A major difficulty was the purification of the compounds. Additionally, molecular modeling studies were performed to assist understanding the release of active agents from dendrimers. Experiments concerning the enzymatic hydrolysis of the dendrimer prodrug composed by PAMAM (generation 1) and 3-hydroxyflavone were also made.

SUMÁRIO

1 Introdução	1
1.1 Doença de Chagas	2
1.1.1 Agente etiológico	2
1.1.2 Epidemiologia	4
1.1.3 Fases da doença de Chagas	5
1.1.3.1 Fase aguda	5
1.1.3.2 Fase crônica	6
1.1.4 Quimioterapia	7
1.1.4.1 Tripanomicidas atualmente utilizados	7
1.1.4.1.1 Nifurtimox e benznidazol	7
1.1.4.2 Tripanomocidas em estudo	10
1.1.4.2.1 Nitrofural	10
1.1.4.2.2 Derivado hidroximetilnitrofural	11
1.2 Leishmaniose	14
1.2.1 Agente etiológico	14
1.2.2 Epidemiologia	16
1.2.3 Manifestações clínicas	17
1.2.3.1 Leishmaniose visceral	18
1.2.3.2 Leishmaniose cutânea	19
1.2.3.3 Leishmaniose mucocutânea	19
1.2.3 Quimioterapia	20
1.3 Flavonóides	25
1.3.1 Flavonóides, leishmaniose e doença de Chagas	26
1.4 Planejamento de novos fármacos	26
1.4.1 Latenciação	27
1.4.1.1 Dendrímeros	28
1.4.1.1.1 Aplicações dos dendrímeros	31
1.4.1.1.2 Dendrímeros como transportadores de fármacos	32
1.4.1.1.3 Síntese dos dendrímeros	35

1.4.1.1.4 Clivagem de dendrímeros	36
1.4.1.1.5 A importância do mio-inositol em dendrímeros potencialmente antichagásicos e leishmanicidas	41
1.6 Modelagem molecular	42
2 Objetivos e justificativas	45
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 modelagem molecular	51
3.2 Métodos	52
3.2.1 Modelagem Molecular (MM)	52
3.2.1.1 Estudos sobre a cisão dos pró-fármacos dendriméricos de primeira geração	52
3.2.1.2 Estudos de dinâmicas moleculares dos pró-fármacos dendriméricos de segunda geração	53
3.2.2 Síntese	54
3.2.2.1 Síntese do derivado hidroximetilnitrofural (NFOH)	54
3.2.2.2 Síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila) acético (ácido málico protegido)	55
3.2.2.3 Síntese dos dendrímeros de primeira e segunda gerações	55
3.2.2.3.1 Método convergente	58
- Síntese do intermediário I (3-hidroxiflavona e ácido málico protegido)	58
- Síntese do intermediário II (desproteção do ácido málico)	61
- Síntese do dendrímero I (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e 3-hidroxiflavona)	62
- Síntese do intermediário III (quercetina e ácido málico protegido)	65
- Síntese do intermediário IV (desproteção do ácido málico)	67
- Síntese do dendrímero III (contendo inositol, ácido L-málico e quercetina)	68
3.2.2.3.2 Método divergente	69

- Síntese do intermediário V (inositol e ácido málico protegido)	71
- Síntese do intermediário VI (inositol e ácido L-málico)	74
- Síntese do dendrímero IV (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e 3-hidroxiflavona)	74
- Síntese do dendrímero V (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e NFOH)	76
3.2.3 Tentativas de purificação dos dendrímeros de primeira geração de 3-hidroxiflavona e quercetina resultantes do método convergente e intermediário de síntese do método divergente	77
3.2.3.1 Cromatografia preparativa	77
3.2.3.2 Recristalização	77
3.2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	77
3.2.3.4 Cromatografia em coluna	78
3.2.3.5 Membrana de diálise	78
3.2.4 Estudos de fotoestabilidade do NF e NFOH	78
3.2.5 Métodos Analíticos	79
3.2.5.1 Espectrofotometria no infravermelho (IV)	79
3.2.5.2 Espectrofotometria no ultravioleta (UV)	79
3.2.5.3 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C	79
3.2.6 Cromatografia	79
3.2.6.1 Em camada delgada (CCD)	79
4 Resultados e discussão	80
4.1 Modelagem molecular	81
4.1.1 Estudos sobre a previsão da cisão dos pró-fármacos dendriméricos de primeira geração	81
4.1.2 Estudos de dinâmicas moleculares dos pró-fármacos dendriméricos de segunda geração	101
4.2 Síntese	107
4.2.1 Síntese do derivado hidroximetilnitrofural (NFOH)	107

4.2.2 Síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila) acético (ácido málico protegido)	107
4.2.3 Síntese dos dendrímeros de primeira geração	108
4.2.3.1 Método convergente	110
4.2.3.1.1 Síntese do intermediário I (3-hidroxiflavona e ácido málico protegido)	109
4.2.3.1.2 Síntese do intermediário II (desproteção do ácido málico)	114
4.2.3.1.3 Síntese do dendrímero I (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e 3-hidroxiflavona)	116
4.2.3.1.4 Síntese do intermediário III (quercetina e ácido málico protegido)	119
4.2.3.1.5 Síntese do intermediário IV (desproteção do ácido málico)	121
4.2.3.1.6 Síntese do dendrímero III (contendo inositol, ácido L-málico e quercetina)	122
4.2.3.2 Método divergente	123
4.2.3.2.1 Síntese do intermediário V (inositol e ácido málico protegido)	124
4.2.3.2.2 Síntese do intermediário VI (inositol e ácido L-málico)	129
4.2.3.2.3 Síntese do dendrímero IV (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e 3-hidroxiflavona)	130
4.2.3.2.4 Síntese do dendrímero V (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e NFOH)	131
4.3 Tentativas de purificação dos produtos sintetizados	131
4.3.1 Dendrímeros de primeira geração de 3-hidroxiflavona e quercetina resultantes do método convergente	131
4.3.1.1 Cromatografia preparativa em camada delgada	131
4.3.1.2 Recristalização	133
4.3.1.3 Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)	134
4.3.1.4 Membrana de diálise	144
4.3.2 Intermediário V resultante do método divergente	143
4.3.2.1 Cromatografia em coluna	143
4.3.3 Intermediário VI resultante do método divergente	143

4.3.3.1 Cromatografia em coluna	143
4.4 Estudos de fotoestabilidade do NF e NFOH	144
5 Conclusões	150
6 Perspectivas	154
7 Referências bibliográficas	156
7 Anexo I: Espectros no IV e de RMN	I
10 Anexo II: Doutorado Sanduíche	LXIII
11 Anexo III: Busca de novos focos centrais para síntese de novos dendrímeros	LXXXVIII
12 Anexo IV: Instruções para banca julgadora	CVI
13 Anexo V: Atividades acadêmicas	CVIII

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

"O CONHECIMENTO É O ÚNICO BEM QUE SE ADQUIRE POR TODA A ETERNIDADE".

DILSON DE OLIVEIRA NUNES

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

1.1.1 Agente etiológico

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da tripanossomíase americana, esquizotripanose ou doença de Chagas. Esse protozoário hemoflagelado e a doença foram descritos e descobertos pelo cientista brasileiro Carlos Chagas, em 1909 (COURA, VIÑAS, 2010; CLAYTON, 2010a). Vetores da doença são insetos hemípteros, da família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*, com grande facilidade de se adaptar em habitats humanos (JUARÉZ, FERNÁNDEZ, 2007).

O ciclo evolutivo da doença de Chagas é complexo e compreende a invasão e consequente estabelecimento do *T. cruzi* em humanos (URBINA, 2010). O protozoário infecta homens, vetores, reservatórios silvestres e animais domésticos. Tripomastigota e amastigota são as formas morfológicas e funcionais relacionadas com os hospedeiros vertebrados. Já os epimastigotas e tripomastigota metacíclicos, com os hospedeiros invertebrados (GARCIA, AZAMBUJA, 1991). O ciclo evolutivo se inicia durante o repasto sanguíneo, quando os vetores ingerem as formas tripomastigotas sanguíneas provenientes do hospedeiro vertebrado (Figura 1). A primeira diferenciação do parasita ocorre no estômago: o tripomastigota transforma-se em epimastigota (GARCIA, DVORAK, 1982; GARCIA, AZAMBUJA, 1991). Na segunda diferenciação, que ocorre no final do intestino e reto, os epimastigotas se transformam nas formas infectantes tripomastigotas metacíclicos. Os tripomastigotas metacíclicos são liberados nas fezes e atingem o hospedeiro vertebrado através pele ou mucosa. Os parasitas invadem diferentes tipos de células no hospedeiro, por exemplo, as musculares cardíacas, nervosas, do trato gastrointestinal e sistema reticuloendotelial. Rapidamente, se diferenciam em amastigotas, que sofrem divisões binárias, como amastigotas, no interior das células infectadas. Eventualmente, os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas que, após a destruição celular, atingem o sangue, iniciando o próximo ciclo de infecção de outras células ou ciclo biológico do parasita quando ingerido pelo

vetor (BRENER, 1973; GARCIA, AZAMBUJA, 1991; MANNING-CELA, JAISHANKAR, SWINDLE, 2006; URBINA, 2010).

FIGURA 1 - Diferentes estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* (adaptado de RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010).

Os principais mecanismos de transmissão da doença de Chagas são: pelo vetor *Triatoma infestans*, por transfusão sanguínea, por via oral, através de alimentos contaminados e pelo contágio vertical da mãe para o filho durante a gravidez. Como mecanismos secundários têm-se acidentes laboratoriais, manipulações de animais contaminados, via sexual, transplante de órgãos (COURA, 2007; PUNUKOLLU *et al.*, 2007). Dentre estas possíveis maneiras de transmissões, destaca-se a contaminação de alimentos por vetores silvestres e reservatórios vertebrados contendo este protozoário (CAMANDAROBÁ, PINHEIRO, ANDRADE, 2002; YOSHIDA, 2008). A ocorrência de casos graves de infecção, conduzindo à morte de indivíduos infectados (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991; PINTO *et al.*, 2001), indica a patogenicidade elevada

do parasita e sua capacidade de penetrar na mucosa gástrica, passando de maneira intacta pelo suco gástrico. A secreção gástrica tem atividade microbicida contra diversos patógenos, porém Hoft e colaboradores (1996) demonstraram que o *T. cruzi* pode invadir e se replicar no epitélio desta mucosa.

Em regiões onde não há controle do vetor, a transmissão vetorial pode ser responsável por mais de 70% dos casos. Cerca de 20% das ocorrências são por transfusões de sangue em países como a Bolívia, onde não há controle sobre os bancos de sangue. A transmissão congênita pode variar de 0,5-10%, no Chile, Bolívia e Paraguai. Pode-se considerar a região amazônica como endêmica para a transmissão oral (FRAIHA, VALENTE, VALENTE, 1995; VALENTE, VALENTE, FRAIHA, 1999; JUNQUEIRA, ALBAJAR, COURA, 2005; PINTO *et al.*, 2008; COURA, DIAS, 2009). No Brasil, a diminuição do número de candidatos chagásicos nos bancos de sangue, assim como a obrigatoriedade da triagem sorológica, reduziram o risco da transmissão transfusional da doença (MORAES-SOUZA; FERREIRA-SILVA, 2011).

1.1.2 Epidemiologia

A doença de Chagas é um grande problema de Saúde pública em muitos países e regiões. Depois da malária, é a segunda maior responsável por índices de prevalência e mortalidade em enfermidades causadas por vetores (WHO, 2002a; 2002b). A doença ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina (Figura 2), porém devido às recentes migrações de populações de regiões endêmicas em direção às não-endêmicas, a doença se expandiu para áreas fora dos limites tradicionais de sua distribuição. Isto é especialmente relevante no contexto de aquisição da enfermidade através de transfusão sanguínea, porém grandes avanços têm sido observados no controle da transmissão transfusional da doença (MOREL, 2000; WHO, 2002b; VINHAES, SCHOFIELD, 2003). A estimativa de infecção humana por *T. cruzi* é de 8 milhões de casos. Aproximadamente 25 milhões de pessoas correm o risco de contrair a infecção. Em 2008, 10.000 pessoas morreram em decorrência da patologia (WHO, 2010). Embora o *T. infestans*, principal vetor da doença, esteja sob controle no Uruguai (desde 1997), Chile (desde 1999), Brasil (desde 2006) e em muitas regiões endêmicas

da Argentina, outras espécies de triatomíneos continuam transmitindo a infecção na América Latina (URBINA, DOCAMPO, 2003; SCHMUNIS, 2007).

FIGURA 2 – Distribuição geográfica da doença de Chagas (adaptado de COURA, DIAS, 2009).

1.1.3 Fases da doença de Chagas

Características determinantes para o desenvolvimento da doença de Chagas são: número de tripomastigota na infecção inicial, linhagem de *T. cruzi* inoculados, reinfecções, tipos de cepas e clones e resposta imunológica do paciente (COURA, 1988; MACEDO, PENA, 1998; ANDRADE *et al.*, 2006; TEIXEIRA, NASCIMENTO, STURM, 2006; ZINGALES *et al.*, 2009).

1.1.3.1 Fase aguda

A fase aguda inicia, aproximadamente, uma semana após a infecção inicial, mas somente um em trinta pacientes crônicos recorda os sinais e sintomas desta etapa. Estes incluem febre, aumento dos linfonodos, inchaço das pálpebras (indicação clássica da doença - sinal de Romaña no local de inóculo do parasita). Pode haver miocardite aguda, com reação inflamatória intensa adjacente à ruptura do alojamento

dos parasitas e danos nos tecidos musculares, febre, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia. É possível identificar os parasitas no sangue durante a fase aguda e testes sorológicos podem mostrar anticorpos IgM para o *T.cruzi* (UMEZAWA *et al.*, 2000). Transmissões congênitas, por via oral, acidental ou transfusões sanguíneas podem resultar em casos agudos da doença de Chagas (MONCAYO, ORTIZ YANINE, 2006).

1.1.3.2 Fase crônica

Após período de, aproximadamente, 2-4 meses das manifestações clínicas iniciais, a doença entra na fase crônica, quando os parasitas não são facilmente detectáveis no sangue, porém testes sorológicos podem tornar-se positivos. Esta fase pode apresentar longo período de latência denominado fase indeterminada, sem sinais e sintomas característicos da patologia, podendo durar cerca 10-30 anos ou por toda a vida do paciente. Neste estágio, eletrocardiograma e estudos radiológicos do sistema digestivo, cardíaco e intestinal são normais (PRATA, 2001; COURA, 2007). Muitos infectados evoluem para manifestações que comprometem órgãos como coração, esôfago, intestino e sistema nervoso central (PRATA, 2001).

A fase crônica digestiva está relacionada com a destruição de neurônios do sistema nervoso entérico. As manifestações clínicas observadas são, principalmente, megaesôfago e megacólon, porém as anormalidades do sistema entérico podem ser encontradas ao longo de todo o intestino (MONCAYO, ORTIZ YANINE, 2006). A motilidade ordenada do esôfago e cólon depende da integridade da inervação intrínseca. A ausência da inervação ou alteração neste sistema faz com que os músculos lisos tornem-se hiper-reativos, contraindo de maneira desordenada, podendo hipertrofiar-se (REZENDE, MOREIRA, 2000).

A fase crônica cardíaca constitui a forma clínica tardia da doença de Chagas, causando problemas no miocárdio e, conseqüentemente, miocardite fibrosante. Os sintomas característicos deste estágio são atribuíveis à insuficiência cardíaca, distúrbios arrítmicos, síndromes tromboembólicas, manifestações anginóides (MARIN-NETO, SIMÕES, SARABANDA, 2000). Mudanças fibróticas e inflamações crônicas no sistema

cardíaco podem ser úteis para a compreensão da elevada incidência de disritmias entre os pacientes chagásicos (EGMAN, LEON, 2002).

São duas as principais hipóteses que explicam a patogênese da doença de Chagas na fase crônica: (a) resposta imunológica induzida pela infecção parasitária capaz de lesionar o tecido do hospedeiro, independente da presença do parasita, e (b) desenvolvimento de reação inflamatória crônica tecidual devido à persistência do *T.cruzi* em determinados tecidos humanos (MONCAYO, ORTIZ YANINE, 2006).

Aproximadamente 30% das pessoas infectadas em fase crônica desenvolvem problemas cardíacos e, cerca de 10%, alterações digestivas, neurológicas ou mistas (WHO, 2010).

1.1.4 Quimioterapia

1.1.4.1 Tripanomicidas atualmente utilizados

A terapêutica da doença de Chagas continua parcialmente ineficaz, apesar dos grandes esforços que vêm sendo encetados para resolver este problema. Nenhum dos fármacos utilizados no tratamento consegue promover cura definitiva em todos os pacientes tratados (COURA, CASTRO, 2002; URBINA, DOCAMPO, 2003).

Para a doença de Chagas, dispõe-se, atualmente, de dois fármacos: nifurtimox e benznidazol (CLAYTON, 2010a e 2010b).

1.1.4.1.1 Nifurtimox e benznidazol

O nifurtimox é eficaz somente em alguns casos do estágio agudo da doença em crianças e adolescentes. O esquema de tratamento para adultos é de 5-7 mg/kg/dia e, em crianças de até 12 anos, recomenda-se 10 mg/kg/dia, divididos em 2 doses por dia. O tratamento pode durar de 30-90 dias (ASTELBAUER, WALOCHNIK, 2011).

Os efeitos colaterais podem ser: anorexia, perda de peso, alterações físicas, excitabilidade, tremores musculares, sonolência, alucinações e manifestações digestivas, como náuseas, vômitos e, ocasionalmente, cólicas intestinais e diarreia. Os

efeitos colaterais podem ser controlados com diazepam, cimetidina, metoclopramida, anti-histamínicos, entre outros. Este fármaco não está atualmente disponível no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai (COURA, CASTRO, 2002; COURA, DIAS, 2009).

nifurtimox

O benznidazol mostra-se ativo nas fases aguda e crônica da doença (FRANÇA, 2011), mas especialmente na primeira. A administração é por via oral e o esquema de tratamento para adultos é de 3 ou 4 doses ao dia de 8-10 mg/kg/dia. Já para crianças de 1-10 anos, as doses são de 15-20 mg/kg/dia, 4 vezes ao dia. Para adolescentes de 11-16 anos são administrados 12,5-15 mg/kg/dia, 4 vezes ao dia. O tratamento pode durar de 90-120 dias (ASTELBAUER, WALOCHNIK, 2011). Os efeitos colaterais observados são sintomas de hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas (normalmente aparecendo entre o sétimo e o décimo dia de tratamento), edema generalizado, linfadenopatia, dores musculares e articulares, púrpura trombocitopênica e agranulocitose, entre outros. Estes efeitos adversos podem ser controlados anti-histamínicos, corticosteróides e, em casos mais graves, é necessária a suspensão do tratamento (COURA, CASTRO, 2002; COURA, DIAS, 2009).

benznidazol

A indústria farmacêutica Roche suspendeu a produção de benznidazol (Rochagan ®) e o governo brasileiro repassou a incumbência ao Laboratório Farmacêutico de Pernambuco, LAFEPE. No entanto, o medicamento ainda não foi produzido, reduzindo, ainda mais, a disponibilidade de fármacos para a doença de Chagas, não só para o Brasil, mas para toda a América Latina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A ação tripanomicida de nitrocompostos está relacionada basicamente à capacidade destes derivados em sofrer biorredução do grupo nitro ($R-NO_2$) e gerar produtos tóxicos para o parasita (Figura 3). Resumidamente, nitrocompostos, na presença de nitrorredutases, sofrem redução de $R-NO_2$ para $R-NH_2$ formando radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. Mais especificamente, este processo de redução do grupo nitro inicia-se com a ação das enzimas NADPH-citocromo P450 redutase, originando o intermediário instável nitro ânion radical, essencial para a atividade desta classe de compostos. Em meio aeróbio, o nitro ânion radical entra em ciclo redox com oxigênio molecular, na presença da enzima superóxido dismutase, originando espécies, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem desestruturar membranas biológicas. Peróxido de hidrogênio, em presença de enzimas ferredoxinas, libera espécies reativas tóxicas capazes de danificar lipídeos, proteínas e DNA do parasita (LA-SCALEA, 1998; MAYA *et al.*, 2007; PORCAL *et al.*, 2007).

Neste contexto, dados experimentais sugerem que o principal mecanismo de ação do nifurtimox está relacionado com a redução intracelular do composto, originando o nitro ânion radical, seguida de um ciclo redox, com a produção das espécies reativas e tóxicas como O_2 e H_2O_2 . O *T. cruzi* não possui um mecanismo eficiente de destoxificação destes tipos de metabólitos, principalmente para peróxido de hidrogênio, tornando-se mais suscetível a este estresse oxidativo, comparativamente às células de vertebrados. Acredita-se que o mecanismo de ação do benznidazol também ocorra por nitrorredução e os intermediários reduzidos atuem ligando-se, covalentemente, a biomacromoléculas tais como DNA, lipídeos e proteínas, gerando efeitos deletérios ao parasita. Além disso, sabe-se que este composto é capaz de atuar sobre a fagocitose, causar a morte do tripanossoma por meio de $IFN-\gamma$ e inibir a enzima NADH-fumarato redutase do parasita (DOCAMPO, MORENO, 1984; RAETHER, HANEL, 2003; MAYA *et al.*, 2007). Vale ressaltar que ambos os fármacos apresentam eficácia discutível para a fase crônica da doença.

Em trabalho realizado por Cançado (2000), a taxa de cura foi investigada, após o tratamento com benznidazol, em 21 pacientes na fase aguda e 113 na fase crônica da doença de Chagas. A cura foi alcançada em 76% dos pacientes agudos, mas em apenas 8% dos crônicos.

FIGURA 3 – Representação esquemática da ação tripanomicida e metabolismo do benznidazol e nifurtimox (adaptado de MAYA *et al.*, 2007). (SOD: superóxido dismutase; $T(SH)_2$: tripanotiona; $T(S)_2$: tripanotiona oxidada; GSH: glutatona; GSSG: glutatona oxidada).

1.1.4.2 Tripanomicidas em estudo

1.1.4.2.1 Nitrofurais

O nitrofurais (NF) foi empregado primeiramente no tratamento de infecções decorrentes de queimaduras e em outras infecções, durante a Segunda Guerra Mundial. A essa época, observou-se atividade antimicrobiana de amplo espectro e baixa incidência de sensibilização (CRENSHAW *et al.*, 1976). Andrade e Brener (1969) observaram a capacidade do composto em provocar extensa destruição no *T. cruzi*. Em 1988, Henderson e colaboradores, estudando a tripanotiona redutase, observaram que derivados de naftoquinona e nitrofurais, incluindo o nitrofurais, apresentavam a capacidade de inibir esta enzima. No entanto, o nitrofurais não foi introduzido na terapêutica antichagásica e, por seus efeitos adversos, é empregado, apenas, para uso tópico em infecções bacterianas (COURA, CASTRO, 2002).

nitrofural

1.1.4.2.2 Derivado hidroximetilnitrofural

Em trabalho desenvolvido por Chung (1996) com pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina, o derivado hidroximetilnitrofural, intermediário de síntese, mostrou-se bastante promissor (CHUNG *et al.*, 2003): atividade aumentada em tripomastigotas e, especialmente, em amastigotas, em relação ao benznidazol, e toxicidade diminuída em quatro vezes, comparativamente ao protótipo (GÜIDO *et al.*, 2001). Em adição, apresentou atividade *in vivo* em modelo murino (DAVIES, *et al.*, 2010). Tal derivado tem estimulado muitos estudos em nosso laboratório e no LaPDESF, Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, liderado pela Professora Chung Man Chin, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, UNESP.

hidroximetilnitrofural

Outros exemplos de tripanomicidas em estudo podem ser observados na Tabela I.

Tabela I – Exemplos de tripanomicidas em estudo

Mecanismo de ação	Fórmula estrutural	Referências
Inibidores da biossíntese de ergosterol	<p>cetoconazol</p>	- Duschak, Couto, 2007 - Maya <i>et al.</i> , 2007
	<p>itraconazol</p>	
Metabolismo de purinas	<p>alopurinol</p>	- Urbina, Docampo, 2003
Interferência no estresse oxidativo	<p>megazol</p>	<i>Megazol:</i> - Viodé <i>et al.</i> , 1999 <i>Primaquina:</i> - La-Scalea <i>et al.</i> , 2001; - Pizzi, 1951 - Chung <i>et al.</i> , 1997.
Inibidores de topoisomerase II	<p>camptotecina</p>	- Coura, Castro, 2002

Tabela I – Exemplos de tripanomicidas em estudo (continuação)

Mecanismo de ação	Fórmula estrutural	Referências
Inibidores da diidrofolato redutase	<p>metotexato e derivados</p>	- Zuccotto <i>et al.</i> , 1999
Inibidores da farnesilpirofosfato sintetase	<p>risedronato</p>	- Coura, Castro, 2002
Inibidores da enzima GAPDH	<p>afrormorsina (isoflavona)</p>	- Tempone <i>et al.</i> , 2007
Inibidores da cruzaina	<p>derivado peptídico</p>	- Jacobs, Ding, 2010
	<p>derivado não-peptídico</p>	

1.2 LEISHMANIOSE

1.2.1 Agente etiológico

A leishmaniose é uma doença causada por 20 diferentes espécies de protozoários unicelulares pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e à família *Trypanosomatidae* (Figura 4). Os protozoários são transmitidos para os hospedeiros vertebrados através da picada de insetos hematófagos, conhecidos como flebotomíneos, pertencentes à subfamília *Phlebotominae* (*Phlebotomus sp* no velho mundo e *Lutzomyia sp* no novo mundo) (MICHALICK, 1998; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; LINDOSO, LINDOSO, 2009; SHUKLA *et al.*, 2010). Apesar de serem casos raros, a leishmaniose pode ser transmitida por seringas contaminadas compartilhadas por usuários de drogas, transplante de órgãos, transfusão de sangue e por contágio vertical da mãe para o filho durante a gravidez (WHO, 2011).

Taxonomia da *Leishmania*

FIGURA 4 – Taxonomia da *Leishmania* (WHO, 2011).

O ciclo evolutivo da *Leishmania* compreende as formas promastigota e amastigota (SHUKLA *et al.*, 2010) e se inicia quando os vertebrados são infectados durante o repasto sanguíneo (Figura 5). As fêmeas dos flebotomíneos inoculam no hospedeiro as

formas flageladas promastigotas infectantes (metacíclicas). Uma vez no organismo, o protozoário adere-se à superfície do macrófago e sofre endocitose. Moléculas externas dos promastigotas como GP-63 (glicoproteína de 63 KD) e LPG (complexo de glicofosforoglicano) têm papel fundamental na adesão do parasita à célula. Após a interiorização, ocorre a transformação para a forma amastigota, sem flagelo livre e intracelular obrigatória do sistema fagocítico mononuclear. A multiplicação excessiva do parasita leva à ruptura celular e liberação de amastigotas na corrente sanguínea, posteriormente fagocitados por outros macrófagos. Assim, podem infectar tecidos diferentes, dependendo da espécie de *Leishmania*, provocando a correspondente manifestação clínica da doença. A contaminação do hospedeiro invertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo em animal ou indivíduo infectado. As formas amastigotas presentes no sangue e/ou na linfa intersticial são ingeridas pelo flebotomíneo. No aparelho digestivo do inseto os parasitas são encontrados em diferentes morfologias dos estágios promastigota e paramastigota. O protozoário pode estar aderido à parede intestinal ou livre no lúmen. Já as formas infectantes, promastigotas metacíclicos, estão presentes na porção anterior do aparelho bucal (proventrículo ou faringe) do inseto. Podem estar livres ou aderidas. O ciclo se completa quando a fêmea, ao se alimentar, inocula no hospedeiro vertebrado as formas infectantes metacíclicas (MICHALICK, 1998; MURRAY *et al.*, 2005; BAILEY, LOCKWOOD, 2007; SHUKLA *et al.*, 2010).

FIGURA 5 – Ciclo evolutivo da *Leishmania* (adaptado de REITHINGER *et al.*, 2007).

1.2.2 Epidemiologia

A leishmaniose é doença negligenciada endêmica em 88 países da América Latina, África, Ásia e sul da Europa. Mais especificamente, a leishmaniose visceral (Figura 6) ocorre em 65 países. Cerca de 90% casos estão localizados em áreas rurais e suburbanas de países como Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil, assim como cerca de 90% dos casos de leishmaniose cutânea (Figura 6) concentram-se no Afeganistão, Argélia, Brasil, Peru, Arábia Saudita e Síria (DESJEUX, 2004; BAILEY, LOCKWOOD, 2007). Entretanto, migrações humanas e mudanças climáticas estão modificando o nicho ecológico do vetor da *Leishmania* e, atualmente, encontram-se infecções humanas em 16 países da Europa, incluindo França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal (SHUKLA *et al.*, 2010). Aproximadamente 350 milhões de pessoas correm o risco de contrair a infecção e estima-se que existam 12 milhões de pessoas infectadas. A incidência em áreas endêmicas é em torno de 500.000 casos de leishmaniose visceral e de 1,5 milhões de leishmaniose cutânea por ano (DESJEUX, 2004; BAILEY, LOCKWOOD, 2007; WHO, 2011).

Distribuição geográfica de leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo *Distribuição geográfica de leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo* *Distribuição geográfica de leishmaniose cutânea por L. tropica e L. aethiopica no Velho Mundo* *Distribuição geográfica de leishmaniose cutânea por L. major no Velho Mundo* **FIGURA 6** – Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea e visceral (2011).

Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html

1.2.3 Manifestações clínicas

A leishmaniose manifesta-se clinicamente como: leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea (PISCOPO, AZZOPARDI, 2006). As características de cada tipo de manifestação dependem de fatores como cepa do protozoário e vetores responsáveis

pela infecção, hospedeiros e meio ambiente envolvido (BAILEY, LOCKWOOD, 2007). As principais cepas de protozoários e as manifestações clínicas relacionadas podem ser observadas na Tabela II.

Tabela II – Principais cepas e manifestações clínicas da leishmaniose no Velho e Novo mundo (WHO, 2011)

Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho mundo	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killicki</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Novo mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanol</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnhami</i>	<i>L. naiffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensis</i>	
Principal tropismo	Viscerotrópico	Dermotrópico	Dermotrópico	Mucotrópico

1.2.3.1 Leishmaniose visceral

Leishmaniose visceral é a manifestação clínica mais grave da doença, podendo causar a morte se o paciente não for medicado. A morte é causada por hemorragia, anemia grave ou infecção secundária. Órgãos como linfonodos, fígado, baço e medula óssea podem ser atingidos. Os sintomas característicos deste tipo de patologia são: febre, perda de peso e de apetite, hepatoesplenomegalia, linfadenopatias, dores abdominais, diarreia, pancitopenia e anemia. As crianças podem apresentar retardamento no crescimento (DESJEUX, 2004; PISCOPO, AZZOPARDI, 2006; NEUBER, 2008; SHUKLA *et al.*, 2010).

Na co-infecção com o vírus HIV, os pacientes geralmente apresentam maiores cargas parasitárias, sintomas atípicos (como gastrointestinais), e baixa contagem de células CD₄. Este grupo de indivíduos não responde bem ao tratamento (MARLES, FARNSWORTH, NEILL, 1989; HOET *et al.*, 2004).

1.2.3.2 Leishmaniose cutânea

As infecções cutâneas podem permancer com características subclínicas ou, após período de incubação variável, as lesões podem evoluir de pápulas para nódulos e, destes, para feridas ulcerativas e desfigurantes, capazes de comprometer a vida social do indivíduo (DESJEUX, 2004; HERWALDT, 1999). As úlceras normalmente desenvolvem-se nas mãos, face e pernas, regiões geralmente descobertas e, portanto, de fácil acesso para o mosquito, podendo durar de meses a anos (NEUBER, 2008; PAVLI, MALTEZOU, 2010). Em adição, a leishmaniose cutânea difusa ocorre em pacientes com problemas no sistema imunológico. Sua gravidade está na disseminação de lesões de difícil cicatrização e possibilidade de recidivas após o tratamento. As consequências devastadoras para o paciente fazem desta doença um grave problema de Saúde pública (DESJEUX, 2004). Úlceras de *Leishmania* normalmente são indolores. Super-infecção bacteriana pode causar lesões doloridas (PAVLI, MALTEZOU, 2010).

1.2.3.3 Leishmaniose mucocutânea

Este tipo de manifestação clínica pode acontecer após a cicatrização de feridas provenientes da leishmaniose cutânea. Lesões desfigurantes da cavidade nasal e faringe são características, levando à mutilação da face do indivíduo infectado. *L. braziliensis*, *L. guyanensis* (novo mundo), *L. donovani* e *L. major* (velho mundo) e em paciente imunodeprimidos, *L. infantum*, podem causar este tipo de infecção (DESJEUX, 2004; PISCOPO, AZZOPARDI, 2006). Fatores que influenciam a progressão da leishmaniose mucocutânea incluem sexo masculino, lesões grandes ou múltiplas e úlceras acima da cintura. Congestão nasal crônica, sangramento, ulceração e

granuloma septal são exemplos de manifestações clínicas da doença. Complicações permanentes ou risco de vida, tais como destruição ulcerativa do nariz, boca, faringe, laringe, perfuração do septo nasal e desfiguração facial podem acontecer com os indivíduos infectados (PAVLI, MALTEZOU, 2010).

1.2.3 Quimioterapia

Existem algumas dificuldades no desenvolvimento de um fármaco ou formulação única para as leishmanioses cutânea e visceral. A primeira delas está relacionada com as diferenças nos locais da infecção no hospedeiro vertebrado. Esta variação morfológica exige padrões farmacocinéticos distintos para as diferentes manifestações da patologia. Além disso, existem, aproximadamente, 20 espécies de *Leishmania* capazes de transmitir a doença com diferentes sensibilidades aos fármacos escolhidos para a terapêutica. Igualmente importante, deve-se ressaltar a preocupação com o aumento da eficácia dos compostos em pacientes imunodeprimidos devido às ocorrências de co-infecção com o vírus HIV (OUELLETTE, DRUMMELSMITH, PAPADOPOULOU, 2004; CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006).

O tratamento da leishmaniose cutânea e visceral baseia-se principalmente nos antimoniais pentavalentes, tais como o estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina. Estes fármacos foram introduzidos na terapêutica na primeira metade do século. O mecanismo de ação destes compostos não é claramente definido e são responsáveis por efeitos colaterais significativos como mialgia, náusea, vômito, cefaléia, anorexia, erupção cutânea, entre outros (MATTOCK, 1999). Além disso, falhas no tratamento ocorrem em 10-25% dos casos, exceto na Índia, onde este valor é superior a 60% devido aos problemas de resistência (SHUKLA *et al.*, 2010). Uma vantagem dos antimoniais pentavalentes é o baixo custo. Como desvantagem tem-se administração por via intramuscular e o tratamento prolongado (20 mg/kg em 21-30 dias) (MALTEZOU *et al.*, 2000; MALTEZOU, 2008).

A miltefosina, uma alquilfosfocolina inicialmente planejada como antineoplásico, é o primeiro composto leishmanicida desenvolvido para administração oral. Nos ensaios clínicos de fase IV, realizados na Índia, 1132 adultos e crianças com leishmaniose

visceral apresentaram taxas de cura de 95%. Os efeitos adversos, principalmente toxicidade gastrointestinal, hepática e renal foram observados em 3% dos pacientes tratados (BHATTACHARYA *et al.*, 2007). Atualmente, o composto é utilizado na Índia, Alemanha e Colômbia. O esquema terapêutico é de 100 mg/kg/dia, por 28 dias, em adultos com até 50 kg, 50 mg/kg/dia em adultos com mais de 50 kg e 2,5 mg/kg/dia em crianças (MALTEZOU, 2010). O composto pode causar teratogenicidade (PAVLI, MALTEZOU, 2010) e tem como desvantagem o alto custo (BERMAN, 2003).

Anfotericina B parece ser uma boa opção de tratamento, porém existem relatos de resistência e o fármaco é teratogênico (BERMAN, 2003).

Alguns dos compostos planejados para a terapia da leishmaniose e seus possíveis mecanismos de ações podem ser observados na Tabela III.

Tabela III – Compostos planejados para a terapia da leishmaniose (SHUKLA *et al.*, 2010)

Mecanismo	Alvo	Inibidores/compostos	Fórmula estrutural	Modo de inibição
Metabolismo da tripanotiona	Tripanotiona redutase (TR)	Antimoniais pentavalentes, por exemplo, o antimoniato de meglumina (Glucantime®)		Estimula produção de IFN-gama e células T
		melarsoprol		Forma complexos covalentes com a TR
		kukoamina A		Tipo misto de inibição da TR
		mepacrina (quinacrina)		Inibidor competitivo da TR
		9-aminoacridinas e 9-tioacridinas	<p>9-Aminoacridinas</p>	9-Aminoacridinas são inibidores competitivos da TR com mais de um sítio de ligação. 9-tioacridinas inibem a TR por cinéticas mistas
		clomipramina

Tabela III – Compostos planejados para a terapia da leishmaniose (SHUKLA *et al.*, 2010) (cont.)

Mecanismo	Alvo	Inibidores/compostos	Fórmula estrutural	Modo de inibição
		altenusina		Inibidor da TR
Transdução de sinal celular	Fosfolípidos e esteróis	miltefosina	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$	Inibidor da biossíntese de fosfolípidos e esteróis
Biossíntese de poliaminas	Ornitina descarboxilase	pentamidina		Interage com o DNA cinetoplasto
Crescimento celular e proliferação	Proteínas e fosfolípidos	nebulizer	-	Inibição da síntese de proteínas e fosfolípidos
Respiração microbiana	Fumarato redutase	licochalcona A		Inibe a conversão de fumarato a succinato e desestrutura a mitocôndria do amastigota
Biossíntese de ergosterol	Esteróis	2',6'-diidroxi-4'-metoxichalcona		Altera a composição dos esteróis
Replicação do DNA	DNA topoisomerase II	flavonóides	Flavona	Inibem a atividade catalítica da topoisomerase II

Tabela III – Compostos planejados para a terapia da leishmaniose (SHUKLA *et al.*, 2010) (cont.)

Mecanismo	Alvo	Inibidores/compostos	Fórmula estrutural	Modo de inibição
Sistema imune	-	vacina de DNA KMP-11	-	Eleva os níveis de IFN-gama e, portanto, estimula a resposta imune
Mecanismo oxidativo	Amastigotas	redox dinitrodifeniltioeteres ativos	-	Geração de espécie reativa de oxigênio em macrófagos contendo amastigotas

1.3 FLAVONÓIDES

Flavonóides constituem um conjunto de compostos polifenólicos, que representam o maior grupo de metabólitos secundários dos vegetais. Nas plantas, são importantes para o crescimento, desenvolvimento e defesa contra agentes externos (Di CARLO *et al.*, 1999).

Podem ser encontrados sob diversas formas estruturais. A maioria delas possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, com dois anéis aromáticos (anéis A e B) unidos a um anel heterocíclico C em C₂ (flavona) ou C₃ (isoflavona) (TASDEMIR *et al.*, 2006). Nos compostos tricíclicos (Figura 7), os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos de (') para o núcleo B (SIMÕES *et al.*, 2001). Os mais comuns apresentam uma dupla ligação entre os C₂ e C₃ e a função cetona no C₄ (TASDEMIR *et al.*, 2006). São encontrados nos alimentos principalmente na forma de heterosídeos, ou seja, conjugados com açúcar, sendo a glicose o mais comum. Outras unidades glicosídicas podem ser a galactose, ramnose, arabinose e xilose (SIMONS *et al.*, 2005).

FIGURA 7 - Núcleo fundamental dos flavonóides (SIMÕES *et al.*, 2001).

Estes compostos vêm despertando interesse por apresentarem atividades biológicas diversas, como por exemplo, inibição de proliferação celular, proteção vascular, inibição da motilidade e secreção intestinal, modulação de atividade enzimática, além de atuação como potenciais antibióticos, antialérgicos, antidiarréicos, antiúlcera, agentes antiinflamatórios, antiespasmódicos e hepatoprotetores (Di CARLO *et al.*, 1999; ROSS, KASUM, 2002).

1.3.1 Flavonóides, leishmaniose e doença de Chagas

Existem poucos antiparasitários na terapêutica e para a doença de Chagas e leishmaniose, em particular, o tratamento não é adequado e os fármacos disponíveis causam efeitos adversos consideráveis, como mencionado anteriormente. A busca por produtos naturais permite a descoberta de novas moléculas com estruturas únicas, de baixo custo, seguras, de fácil administração, alta atividade e seletividade, podendo ser otimizadas por processos sintéticos parciais ou completos (KAYSER, KIDERLEN, CROFT, 2003; TASDEDMIR *et al.*, 2006; TEMPONE *et al.*, 2007).

Flavonóides, segundo Tempone e colaboradores (2007), são promissores compostos para o combate ao mal de Chagas. Estudos realizados por estes pesquisadores selecionaram moléculas com atividade tripanomicida atingindo valores de IC_{50} iguais a 0,11 pM. Em adição, Tasdemir e colaboradores (2006) avaliaram a atividade leishmanicida e antichagásica de uma série de flavonóides. Os compostos 3-hidroxiavona e quercetina apresentaram os valores de IC_{50} de 2,94 e 3,30 μ M, respectivamente, quase comparáveis com o padrão miltefosina, IC_{50} de 2,72 μ M. Portanto, as evidências mostram que esta classe de compostos polifenólicos é constituída de potenciais candidatos para o tratamento destas importantes doenças tropicais negligenciadas.

1.4 PLANEJAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

A modificação molecular tem se mostrado processo promissor para a introdução de novos fármacos na terapêutica (KOROLKOVAS, 1988; MEYER, 1996; BARREIRO, FRAGA, 2008; WERMUTH, 2008). Tal processo permite que as propriedades indesejáveis dos protótipos sejam diminuídas e as características desejáveis ressaltadas mediante retirada, substituição, introdução de grupos químicos, cuja participação na atividade biológica é determinante, ou cuja função acessória pode auxiliar na interação com o receptor. Apesar de, em geral, a modificação molecular clássica não utilizar as bases moleculares da doença como suporte racional para o planejamento de novos fármacos, esse foi o processo mais profícuo de introdução de

fármacos na terapêutica até o presente. Dentre os métodos de planejamento de novos fármacos, destaca-se a latenciação.

1.4.1 Latenciação

A latenciação consiste na transformação de fármaco em forma inativa de transporte, que, mediante reação química ou enzimática *in vivo*, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele (BUNDGAARD, 1985; TESTA, CALDWELL, 1996; CHUNG, FERREIRA, 1999; ETTMAYER *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; WERMUTH, 2008). Uma das formas latentes obtidas por esse processo é denominada pró-fármaco (WERMUTH, 1984). A Figura 8 mostra esquematicamente o conceito clássico de latenciação.

FIGURA 8 - Representação esquemática de latenciação clássica. F – fármaco; T- transportador (Adaptado de FRIIS, BUNDGAARD, 1996).

WERMUTH, em 1984, classificou as formas latentes em: pró-fármacos clássicos, bioprecursores e fármacos dirigidos.

O planejamento por meio da latenciação pode ser dividido em três passos básicos:

- 1- Identificação do problema associado ao fármaco;
- 2- Identificação das propriedades físico-químicas a serem alteradas;
- 3- Escolha do transportador adequado, no caso de pró-fármacos clássicos e fármacos dirigidos, e da ligação a ser cindida no compartimento biológico desejado.

Os *pró-fármacos clássicos* compreendem área da pesquisa de fármacos que é voltada, especialmente, para a otimização das propriedades farmacêuticas e farmacocinéticas correspondentes (FRIIS, BUNDGAARD, 1996; TESTA, CALDWELL, 1996), que limitam seu emprego clínico. Em geral, o termo *pró-fármaco* implica ligação covalente entre o grupo ativo e o transportador, mas alguns autores também o usam para caracterizar algumas formas de sais de princípios ativos. Através da ligação com um transportador adequado, pode-se superar a barreira limitante ao fármaco de origem. Uma vez ultrapassada a barreira, o *pró-fármaco* é revertido ao protótipo por sistemas enzimáticos ou não. O enfoque do *pró-fármaco* como um modo de se otimizar a distribuição do fármaco passou por significativa expansão nas duas décadas passadas e mais de 50 compostos farmacologicamente ativos são clinicamente usados sob essa forma, nos últimos anos (ETTMAYER *et al.*, 2004).

A relação entre *pró-fármacos*, doenças negligenciadas e extremamente negligenciadas foi amplamente discutida em interessante artigo publicado por Chung e colaboradores (2008).

Os *pró-fármacos clássicos* podem ser subdivididos em duplos ou triplos, ou em cascata, *pró-fármacos recíprocos* e *pró-fármacos mistos*. O transportador pode ser ligado ao fármaco por meio de grupos espaçantes (BUNDGAARD, 1985). Este grupo permitiria maior acesso das ligações às enzimas, quando for o caso, facilitando a liberação do fármaco de sua forma de transporte. *Pró-fármacos duplos, triplos ou em cascata* são aqueles que apresentam liberação por mais de uma etapa, por vias química e/ou enzimática.

Como no caso de *pró-fármacos clássicos* é possível, por meio de transportadores adequados, conseguir o controle da liberação dos fármacos. Importantes pesquisas por novas formas visando a esse objetivo estão sendo realizadas. Nesse particular, os dendrímeros (FISHER, VÖGTLE, 1999) vêm despertando interesse.

1.4.1.1 Dendrímeros

A química dos dendrímeros foi descrita pela primeira vez, em 1978, por Vögtle e colaboradores. Estes pesquisadores sintetizaram as primeiras "moléculas em cascata".

Porém, as dificuldades sintéticas resultaram na formação de compostos de baixa geração. Assim, as primeiras famílias de dendrímeros em gerações maiores e bem definidas foram reportadas por Tomalia e colaboradores (TOMALIA *et al.*, 1985) e Newkome e colaboradores (NEWKOME *et al.*, 1985).

Dendrímeros, do grego (dendron = árvore, meros = parte), são novas arquiteturas moleculares, nas quais os compostos originam-se de um centro e, como uma árvore, tornam-se mais ramificados em cada subsequente unidade de ligação (FISHER, VÖGTLE, 1999). A estrutura da molécula é dividida em três regiões distintas: um foco central, camada de ligações repetidas partindo do centro e grupos funcionais na camada externa das unidades repetidas (GRAYSON, FRÉCHET, 2001).

A importância desta nova classe de materiais está na capacidade de se obter estruturas com forma globular e massa molecular única. Os dendrímeros são extremamente ramificados e comportam-se como macromoléculas tridimensionais reativas (LIU, FRÉCHET, 1999). Apresentam grande número de funcionalidades periféricas e são moléculas nanoscópicas, com tamanho próximo de 10-30 Å (PILLAI, PANCHAGNULA, 2001). São macromoléculas que têm atraído grande atenção no campo emergente da nanotecnologia (YANG, KAO, 2006), como transporte de fármacos, terapia gênica e quimioterapia (PATEL *et al.*, 2010; MINTZER, GRINSTAFF, 2011).

Os domínios sobre as sínteses dos dendrímeros tornam estes compostos extremamente ordenados e com estruturas controladas. A síntese é realizada passo-a-passo, utilizando-se unidades ramificadas denominadas *dendron* (monômeros). Dessa maneira, é possível obter-se precisão no tamanho, forma, dimensão, polaridade, flexibilidade e solubilidade destes nanocompostos (TOMALIA, NAYLOR, GODDARD, 1990; MCCARTHY *et al.*, 2005). Estas características, além da arquitetura altamente ramificada, com baixa polidispersividade e grande número de funcionalidades periféricas, são as principais diferenças dos dendrímeros e polímeros tradicionais (YANG, KAO, 2006).

O centro do dendrímero determina a plataforma que será construída e contribui para a quantidade de grupos funcionais do composto final. A diversidade das estruturas

dendríticas depende da escolha do grupo de superfície e do tipo de ligantes que serão utilizados (McCARTHY *et al.*, 2005).

Propriedades dos dendrímeros como solubilidade e reatividade química são determinadas pela natureza dos grupos terminais. Estes grupos aumentam exponencialmente em cada geração e, portanto, constituem a interface entre o dendrímero e o meio externo (GRAYSON, FRÉCHET, 2001).

O dendrímero de poliamidoamina (PAMAM, *Starburst™*) foi o primeiro dendrímero a ser sintetizado completamente por abordagem divergente e caracterizado (ESFAND, TOMALIA, 2001). É comercializado pela *Dendritech* (Midlan, USA) e pode apresentar variações de diâmetro entre 1,5 a 14,5 nm, dependendo de suas gerações (YANG, KAO, 2006). Estes compostos apresentam baixa imunogenicidade e toxicidade em células de mamíferos, principalmente quando a superfície contém grupos aniônicos (tais como carboxilas e hidroxilas) ou neutros (CAI *et al.*, 2003).

Quanto maior a geração do dendrímero, devido à sua estrutura globular compacta, menor o volume que ocupam e observam-se diferenças na solubilidade e reatividade dos grupos de superfície, quando comparados aos polímeros lineares correspondentes (JAIN *et al.*, 2010; MINTZER, GRINSTAFF, 2011). As principais diferenças entre os dendrímeros e polímeros lineares podem ser observadas na Tabela IV.

Tabela IV – Principais diferenças entre dendrímeros e polímeros (PATEL *et al.*, 2010)

Propriedade	Dendrímeros	Polímeros lineares
Estrutura	Compacto, globular	Não compacto
Síntese	Crescimento passo a passo	Passo único de policondensação
Controle estrutural	Elevado	Baixo
Arquitetura	Regular	Irregular
Forma	Esférica	Randômica
Cristalinidade	Não-cristalino, material amorfo	Semi cristalino/cristalino
Solubilidade aquosa	Elevada	Baixa
Solubilidade não polar	Elevada	Baixa
Viscosidade	Relação não-linear com massa molecular	Relação linear com massa molecular
Reatividade	Elevada	Baixa
Compressibilidade	Baixa	Elevada
Polidispersividade	Monodisperso	Polidisperso

1.4.1.1.1 Aplicações dos dendrímeros

Algumas das aplicações dos dendrímeros incluem a possibilidade de atuar como potenciais transportadores de genes em cultura de células de mamíferos, sensores químicos (WELLS, CROOCKS, 1996), catalisadores (BU *et al.*, 2003), no desenvolvimento de vacinas, antivirais, antimicrobianos, terapia do câncer, enzimas artificiais e na obtenção de imagens em ressonância magnética por apresentarem grupos reativos nas porções terminais. Características como polidispersão estreita e escala manométrica podem facilitar a passagem através de barreiras biológicas, por exemplo, os tecidos endoteliais (PATEL *et al.*, 2010).

O PAMAM vem despertando interesse no desenvolvimento de materiais altamente especializados por oferecer estrutura perfeitamente controlada (LIU, FRÉCHET, 1999; D'EMANUELE, ATTWOOD, 2005; YANG, KAO, 2006; PATEL *et al.*, 2010). O FDA

(*Food and Drug Administration*) aprovou a comercialização de diversos produtos que têm dendrímeros como suporte, como por exemplo, o *VivaGel™* (Starpharma), útil como microbicida de uso tópico para a prevenção da aquisição do vírus HIV ou de outras doenças sexualmente transmissíveis; *SuperFect®*, desenvolvido pela Qiagen, é utilizado na transferência de genes em linhagens celulares. O *US Army Research Laboratory* desenvolveu o *Alert Ticket™* para a detecção do vírus Anthrax, entre outras aplicações. Em 1984, Tomalia divulgou a primeira patente sobre dendrímeros e, atualmente, existem cerca de 800 trabalhos sobre estes nanocompostos, demonstrando seu crescente interesse pela comunidade científica (YANG, KAO, 2006).

Glicodendrímeros, segundo Cloninger (2002), são exemplos de dendrímeros que possuem carboidratos na estrutura e têm sido úteis em diversas aplicações biológicas, como, por exemplo, nos estudos na interação carboidrato-proteína, fundamental para o reconhecimento intercelular. Além disso, outras aplicações vêm despertando interesse: incorporação em metodologias analíticas (SNEJDARKOVA *et al.*, 2001), formação de gel (McWATT, BOONS, 2001), alvos para agentes de contraste de imagens de ressonância magnética nuclear e para sistemas de liberação de genes e fármacos. Estes dendrímeros apresentam baixa polidispersividade, se comparados com os glicopolímeros. As gerações destes compostos são responsáveis pelo tamanho da estrutura dendrítica.

Os peptidodendrímeros apresentam peptídeos enxertados na superfície, nas quais as ramificações possuem aminoácidos a partir de um centro. São mais solúveis em água, mais estáveis para proteólise e menos tóxicos para células humanas que os análogos poliméricos lineares. Apresentam aplicações potenciais como peptidomiméticos, agentes antivirais e anticâncer, vacinas e sistemas de liberação de genes e fármacos (CLONINGER, 2002). Lisina é o aminoácido mais comum para a gênese de um peptidodendrímero (SADLER, TAM, 2002).

1.4.1.1.2 Dendrímeros como transportadores de fármacos

Segundo Langer (1998), espera-se de um pró-fármaco polimérico as seguintes características: (a) manutenção da concentração de fármaco ao nível terapêutico; (b)

redução de efeitos adversos; (c) diminuição da dose e administrações, proporcionando maior adesão do paciente ao tratamento e (d) forma farmacêutica que facilite as administrações, quando aplicada a fármacos com tempo de meia-vida baixo. Devido ao controle do tamanho, estrutura e reatividade de superfície, os dendrímeros são excelentes candidatos ao transporte de fármacos (CRAMPTON, SIMANEK, 2007). Além disso, a baixa polidispersividade e tamanho nanoscópico podem facilitar a passagem por barreiras biológicas, por exemplo, o extravasamento pelos tecidos vasculares endoteliais (MUKHERJEE, PATRA, SARKAR, 2011).

Os principais tipos de planejamento para um pró-fármaco dendrimérico são: (1) fármaco ligado diretamente à superfície do dendrímero, envolvendo interações eletrostáticas e covalentes (LIU, FRÉCHET, 1999; D'EMANUELE, ATTWOOD, 2005); (2) interação com a malha dendrimérica por meio de espaçante (NAJHLA *et al.*, 2007a, 2007b); (3) *dendrons* contendo fármacos, proporcionando aumento exponencial da substância ativa a cada subsequente geração, que mereceu pedido de patente por Giarolla e Ferreira, em 2008, em análise; (4) fármacos dentro da estrutura dendrítica, em que as interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações hidrogênio devem ser consideradas (LIU, FRÉCHET, 1999; D'EMANUELE, ATTWOOD, 2005).

Dendrímeros apresentam características que os tornam potenciais transportadores de fármacos para a administração oral. Esta via de administração apresenta vantagens significativas, por exemplo, segurança, baixo custo e a boa adesão do paciente (PATEL *et al.*, 2010). Então, os dendrímeros podem aumentar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de compostos no organismo, proporcionar liberação controlada, apresentar propriedades que permitam a sua adesão na mucosa intestinal para prolongar a liberação da substância ativa no intestino, além de poder aumentar a absorção de fármacos por penetrar facilmente pelas membranas intestinais (CHENG *et al.*, 2007).

D'Emanuele e seu grupo investigaram o efeito da geração de pró-fármacos dendriméricos de propranolol sobre a citotoxicidade e permeação em células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) (D'EMANUELE *et al.*, 2004). O propranolol possui baixa biodisponibilidade por ser substrato da glicoproteína P e pouco solúvel. O aumento na concentração e geração do dendrímero resultou em aumento na

citotoxicidade e permeação. Redução na citotoxicidade e aumento da permeabilidade foram observados quando o cloreto de lauroíla foi conjugado ao composto. Em outro trabalho com abordagem semelhante, o transportador dendrimérico também aumentou significativamente a permeabilidade, em Caco-2, de terfenadina (NAJLAH *et al.*, 2007b).

O gráfico 1 mostra o perfil farmacocinético de um determinado fármaco relacionando: (1) fármaco administrado sozinho; (2) fármaco adsorvido no interior da malha dendrimérica e (3) fármaco ligado covalentemente na superfície do dendrímero. Pode-se ressaltar que a encapsulação da molécula na cavidade hidrofóbica ou a ligação na estrutura do dendrímero mantém as propriedades químicas e farmacológicas do protótipo. Em adição, quando o fármaco está covalentemente ligado ao dendrímero, observa-se melhor controle sobre a liberação do composto (UHRICH *et al.*, 1999; AULENTA, HAYES, RANNARD, 2003). Portanto, pró-fármacos dendriméricos podem oferecer, além de direcionamento do fármaco aos tecidos, liberação mais lenta, quando comparados ao composto administrado sozinho (CHENG *et al.*, 2007).

Gráfico 1 – Perfil farmacocinético (1) fármaco administrado sozinho; (2) fármaco adsorvido no interior da malha dendrimérica; (3) fármaco ligado covalentemente na superfície do dendrímero (CHENG *et al.*, 2007).

Gerações 4 e 5 do PAMAM ligado à fluoruracila para a liberação mais lenta do composto (ZHUO, DU, LU, 2005); ácido aminossalicílico (5-ASA), covalentemente ligado com espaçantes por meio de azo-ligações para liberação no cólon intestinal (WIWATTANAPATAPEE, LOMLIM, SARAMUNNE, 2003), propranolol ligado à

superfície da geração 3 do PAMAM para aumentar a biodisponibilidade deste composto (D'EMANUELE *et al.*, 2004) são exemplos de pró-fármacos dendriméricos úteis na terapêutica.

1.4.1.1.3 Síntese dos dendrímeros

Desde 1979, duas estratégias principais de síntese vêm sendo desenvolvidas para os dendrímeros (TOMALIA *et al.*, 1985). A primeira consiste no *método divergente* (Figura 9), em que o dendron cresce a partir de um centro (árvore molecular) (BUHLEIER *et al.*, 1978, TOMALIA *et al.*, 1985; NEWKOME *et al.*, 1985). Este centro reage com monômeros moleculares contendo um grupo reativo e dois não-reativos, resultando na primeira geração dos dendrímeros. Em seguida, a periferia da nova molécula é ativada para reagir com mais monômeros. É útil para a produção de grande quantidade de dendrímeros. O problema deste tipo de síntese é a ocorrência de reações incompletas, que levam à formação de estruturas defeituosas. Para prevenir reações adversas, deve ser usado excesso de reagente, apesar da dificuldade na purificação do produto (KLAJNERT, BRYSEWSKA, 2001; MINTZER, GRINSTAFF, 2011). Durante os anos 1980, estruturas dendríticas foram construídas pelo método de árvore molecular. A abordagem divergente é preferida em rotas sintéticas de uso comercial no mundo todo (ESFAND, TOMALIA, 2001).

O segundo método é conhecido como processo de *crescimento convergente* descrito pela primeira vez por Fréchet e colaboradores (HAWKER, FRÉCHET, 1990) (Figura 9). Neste, a superfície molecular do dendrímero (isto é, as folhas das árvores) reagem com o foco central. Para a obtenção da estrutura dendrítica, várias ramificações reagem com o foco multifuncional (ESFAND, TOMALIA, 2001). Quando as moléculas crescentes são grandes o suficiente para determinada geração, várias delas são ligadas a um centro apropriado para formar o dendrímero (MATTHEWS, SHIPWAY, STODDART, 1998). Como vantagem para este tipo de síntese está o fato de esta ser de fácil purificação e a ocorrência de defeitos nas estruturas terminais é minimizada (HAWKER, FRÉCHET, 1990; KLAJNERT, BRYSEWSKA, 2001). No entanto, dificuldades de reações entre grandes ramificações e os centros fazem com que esta

abordagem seja útil apenas para a obtenção de gerações menores. Porém, isto não significa uma limitação, uma vez que, muitas moléculas utilizadas em aplicações biomédicas são de até quarta geração (MINTZER, GRINSTAFF, 2011).

O método de síntese ortogonal é completamente independente de grupos de proteção. A proteção ou etapas de ativação são eliminadas pelo uso sequencial de dois diferentes blocos de construção em duas reações acopladas ortogonais (ZENG, ZIMMERMAN, 1996).

FIGURA 9 - Esquema de síntese divergente e convergente, respectivamente (adaptado de BOAS, HEEGAARD, 2004).

1.4.1.1.4 Clivagem de dendrímeros

D'Emanuele e seu grupo publicaram dois trabalhos interessantes sobre estudos de liberação de pró-fármacos dendriméricos (NAJLAH *et al.*, 2006; NAJLAH *et al.*, 2007a). No primeiro deles (NAJLAH *et al.*, 2006) avaliou-se, *in vitro*, a natureza da ligação covalente entre o antiinflamatório não-esteróide naproxeno, o espaçante e o dendrímero de poliamidoamina, PAMAM de geração zero. O comportamento da ligação amida foi analisado no composto sintetizado com naproxeno ligado diretamente ao dendrímero. Já a hidrólise das ligações ésteres foram estudadas com as moléculas contendo os espaçantes ácido láctico e dietilenoglicol. Vale ressaltar que é desejável que esta ligação hidrolisável seja estável durante a passagem por células epiteliais e trato gastrointestinal, porém instável após a absorção do derivado dendrimérico. Os ensaios

em diferentes pH e plasma humano mostraram que a ligação amida entre o naproxeno e o PAMAM não é apropriada para o planejamento de um pró-fármaco por apresentar elevada estabilidade química e enzimática. Por outro lado, o composto com o éster entre o ácido láctico e dendrímero foi hidrolisado lentamente e pode atuar como potencial pró-fármaco no organismo. Já os que continham o dietilenoglicol foram estáveis quimicamente, mas prontamente hidrolisados em plasma. Provavelmente, o maior comprimento da cadeia carbônica deste último espaçante resultou em ligação mais facilmente clivável. Em adição, a manutenção do éster entre o dietilenoglicol e o PAMAM por 6 horas na presença do paraoxon (inibidor de carboxilesterase tipo B) comprovou a atividade desta enzima na clivagem do pró-fármaco.

O segundo trabalho (NAJLAH *et al.*, 2007a) comparou a estabilidade em plasma humano e homogeneizado de fígado de rato dos 3 conjugados anteriormente descritos. A ligação amida direta entre o naproxeno e PAMAM gerou pró-fármaco de alta estabilidade em ambos os ensaios. O espaçante ácido láctico conferiu hidrólise lenta em plasma e enzimas do fígado, portanto este ácido é interessante para ser utilizado no planejamento de compostos de liberação lenta e controlada. Por outro lado, o conjugado com dietilenoglicol foi rapidamente hidrolisado nos 2 experimentos. Portanto, tais compostos podem ser promissores no transporte de fármacos de baixa solubilidade, como naproxeno.

Apenas um estímulo físico ou químico pode iniciar o processo espontâneo de clivagem múltipla e controlada do dendrímero, resultando na liberação de subunidades ou fragmentos maiores da macromolécula dendrímica. Este processo químico pode ser útil para, por exemplo, liberar substâncias ativas que estão ligadas covalentemente na estrutura dendrítica (McGRATH, 2005).

O processo de desintegração de um dendrímero (Figura 10) pode acontecer de diversas maneiras, dependendo da natureza do composto. Os principais modos de degradação são: (1) liberação de substâncias ativas ou espécies químicas menores não ligadas covalentemente ao dendrímero (D'EMANUELE, ATTWOOD, 2005; SMITH, 2006); (2) hidrólise de ligações covalentes consecutivas com remoção inicial de grupos funcionais da periferia, seguida da quebra das ramificações (ou parte delas) com o núcleo, atingindo a completa (bio)degradação em espécies químicas simples

(GINGRAS, RAIMUNDO, CHABRE, 2007), e (3) modo combinado em que a hidrólise de ligações covalentes da periferia é fundamental para a liberação das moléculas não ligadas covalentemente (HAAG, KRATZ, 2006; GINGRAS, RAIMUNDO, CHABRE, 2007).

FIGURA 10 - Principais modos de desintegração dos dendrímeros (adaptado de GINGRAS, RAIMUNDO CHABRE, 2007).

Entre 2003/2004, três grupos de pesquisa publicaram, quase simultaneamente, os primeiros métodos racionais de planejamento e síntese de dendrímeros passíves de sofrer desintegração controlada (SHABAT, 2006). Os termos, em inglês, ficaram conhecidos como: *self-immolative dendrimers* (AMIR *et al.*, 2003), *cascade-release dendrimers* (de GROOT *et al.*, 2003) e *geometrically disassembled dendrimers* (SZALAI, KEVWITCH, McGRATH, 2003). Todos defenderam o mesmo princípio de que uma unidade química incorporada com uma sequência específica no dendrímero poderia desencadear a desintegração controlada do composto por meio de um estímulo externo. Em uma analogia aos polímeros, seria um processo de despolimerização (GINGRAS, RAIMUNDO CHABRE, 2007). Exemplos de alguns compostos que podem promover o início da clivagem dos dendrímeros por estímulo externo podem ser vistos na Figura 11.

FIGURA 11 - Unidades químicas e estímulos externos, que podem promover as reações de clivagem em cascata dos dendrímeros. As setas brancas indicam os pontos iniciais das reações em série e as linhas tracejadas, as ligações que serão clivadas (adaptado de GINGRAS, RAIMUNDO CHABRE, 2007).

Os estímulos externos podem ocorrer por variações de pH (NAJLAH *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2005), reações fotoquímicas (NISHIYAMA *et al.*, 2005; SZALAI, McGRATH, 2004a, 2004b), influência de metais de transição (SZALAI, KEVWITCH, McGRATH, 2003), enzimas (hidrólise enzimática de ésteres, amidas e carbamatos) (SEEBACH *et al.*, 1996; YANG, LOPINA, 2006), anticorpos catalíticos (HABA *et al.*, 2005; SHAMIS, LODE, SHABAT, 2004), reação redox (ONG, McCARLEY, 2005; SZALAI, McGRATH, 2004) ou processos térmicos (GINGRAS, RAIMUNDO CHABRE, 2007).

Os principais grupos funcionais utilizados no planejamento de métodos de clivagem em cascata de dendrímeros são ésteres, amidas e carbamatos. Ésteres e carbamatos são preferidos em relação às amidas por hidrolisarem mais facilmente (GINGRAS, RAIMUNDO CHABRE, 2007).

A desintegração dendrímica pode acontecer de modo linear (aritmético) ou geométrico (Figura 12) (McGRATH, 2005). O primeiro deles ocorre após um estímulo no centro ou periferia do dendrímero, em um único ponto de clivagem, quebrando a

estrutura, através de uma cascata de reações, em vários fragmentos relativamente grandes. Por outro lado, no modo geométrico, em uma estrutura que tem, por exemplo, uma proporção centro/ramificação de 1:2, cada evento de clivagem originará dois eventos de clivagens subsequentes, fragmentando o dendrímero em suas subunidades constitutivas.

FIGURA 12- Principais modos de desintegrações dos dendrímeros (adaptado de McGRATH, 2005).

Exemplo da aplicação da clivagem enzimática controlada de um pró-fármaco dendrimérico encontra-se no trabalho publicado por Haba e colaboradores (2005). Neste, camptotecina, doxorubicina e etopósido foram ligados covalentemente a uma unidade química adaptadora (Figura 13). Um único evento químico com anticorpo catalítico 38C2 desencadeou o processo de degradação do pró-fármaco, liberando três fármacos diferentes a partir de uma reação em cascata. O pró-fármaco dendrimérico foi mais potente que os fármacos administrados separadamente em ensaios *in vitro* com o anticorpo.

FIGURA 13 - Exemplo de clivagem programada de pró-fármaco dendrimérico (adaptado de GINGRAS, RAIMUNDO CHABRE, 2007).

1.4.1.1.5 A IMPORTÂNCIA DO *MIO*-INOSITOL EM DENDRÍMEROS POTENCIALMENTE ANTICHAGÁSICOS E LEISHMANICIDAS

O inositol ou *mio*-inositol é um componente essencial para o desenvolvimento celular de mamíferos e de outros organismos vivos, por exemplo, protozoários patogênicos *Leishmania* ssp e *T. cruzi* (McCONVILLE, FERGUSON, 1993; OLIVEIRA, EINICKER-LAMAS, 2000; EINICKER-LAMAS *et al.*, 2007). A importância deste poliálcool cíclico está em sua participação como precursor biossintético de constituintes da superfície celular, cuja molécula inicial é o fosfolípídeo fosfatidilinositol. Este derivado pode ser fosforilado ou glicosilado para originar novos compostos bioativos como os fosfoinositídeos e glicosilfosfatidilinositol (OLIVEIRA, EINICKER-LAMAS, 2000; EINICKER-LAMAS *et al.*, 2007). Moléculas de inositol fosforilado, como o glicosilfosfatidilinositol, estão presentes em todos os estágios de vida dos tripanossomatídeos e, dessa maneira, esta rota biossintética pode ser considerada um alvo promissor no desenvolvimento de novos fármacos para o combate de tripanossomíases (McCONVILLE, FERGUSON, 1993; OLIVEIRA, EINICKER-LAMAS, 2000; EINICKER-LAMAS *et al.*, 2007).

***mio*-inositol**

Muitas células adquirem o *mio*-inositol do meio extracelular. Outras são capazes de biossintetizá-lo a partir da glicose (NIKAWA, TSUKAGOSHI, YAMASHITA, 1991; OLIVEIRA, EINICKER-LAMAS, 2000). Neste contexto, ainda não se sabe se o *T. cruzi* é capaz de biossintetizar este composto, mas estudos realizados por Einicker-Lamas e colaboradores (1999) demonstraram que a ausência deste precursor em meio de cultura prejudicou o crescimento de epimastigotas. No ano seguinte, Einicker-Lamas e colaboradores (2000) perceberam a necessidade de sódio extracelular no transporte do inositol, classificando este deslocamento transmembrana como simporte $\text{Na}^+/\text{inositol}$. Ainda não se descobriu quais são os genes específicos da proteína envolvida no transporte do inositol, mas estudos futuros poderão elucidar este sequenciamento, uma vez que o genoma do *T. cruzi* foi completamente descrito por El-Sayed e colaboradores (2005).

É importante ressaltar a diferença do modo de obtenção de inositol em *L. donovani*. Nestes protozoários este poliálcool cíclico atravessa a membrana por um transportador estruturalmente relacionado com os transportadores específicos responsáveis pelo deslocamento transmembrana facilitado da glicose de células mamíferas (LANGFORD *et al.*, 1992). Esta proteína depende de prótons para a manutenção da concentração intracelular de inositol ($\text{inositol}/\text{H}^+$) (DREW *et al.*, 1995).

1.6 MODELAGEM MOLECULAR

Durante os anos 1980, a modelagem molecular passou de pesquisa básica realizada em laboratórios de universidades a componente crítico para o desenvolvimento racional de novos agentes terapêuticos para doenças humanas, com aplicações amplas na Química Farmacêutica ou Medicinal (TAYLOR, TRIGGLE, 2007;

COHEN, 1988). Esta ferramenta computacional vem despertando interesse da comunidade científica em diferentes áreas. Para o estudo de polímeros biológicos como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos, por exemplo, os biólogos descrevem a estrutura celular, farmacêuticos e químicos estudam os detalhes atômicos e moleculares, físicos avaliam os níveis eletrônicos e as forças relacionadas, matemáticos formulam modelos matemáticos e algoritmos e os cientistas computacionais e engenheiros geram programas e plataformas computacionais necessários para o desenvolvimento do trabalho. As diferentes denominações ressaltam sua natureza multidisciplinar: biologia computacional, química computacional, biologia *in silico*, biologia estrutural computacional, biofísica computacional, biofísica teórica, química teórica, entre outras (SCHLICK, 2010).

A modelagem molecular utiliza programas computacionais ou algoritmos para calcular informações sobre as propriedades de compostos como energia mínima, cargas atômicas, momento de dipolo, calor de formação, entre outras (PATRICK, 2008). Além disso, esta técnica permite a obtenção de modelos para análise de um determinado protótipo a partir da construção, edição e visualização tridimensional das estruturas para melhor compreensão das relações entre propriedades físico-químicas, características moleculares e a atividade biológica de um determinado composto (BARREIRO, RODRIGUES, 1997; CARVALHO *et al.*, 2003; SILVA, 2002).

Existem duas classificações para o planejamento racional de fármacos a partir da modelagem molecular: planejamento com base na estrutura do receptor (SBDD) e planejamento com base na estrutura do ligante (LBDD). No primeiro, é conhecida a estrutura do receptor (por cristalografia de raios-X, RMN, por exemplo). Já o segundo compreende a utilização de dados de ligantes que possam elucidar a natureza da interação com o receptor. Assim, trabalha-se com modelos topográficos destas macromoléculas orgânicas na tentativa de se obter parâmetros eletrônicos ou estéricos, que facilitem a compreensão da interação fármaco-receptor (BARREIRO, RODRIGUES, 1997; SILVA, 2002).

Segundo Patrick (2008), os métodos utilizados para calcular as propriedades das estruturas podem ser:

1. Mecânica molecular: as estruturas moleculares geradas em modelagem molecular devem passar por procedimento prévio de otimização de geometria para que seja obtido o estado de energia mínima. Esta conformação pode ser obtida por métodos de mecânica molecular (HÖLTJE, FOLKERS, 1997). As equações oriundas da mecânica clássica são utilizadas para calcular diferentes interações e energias resultantes da avaliação de estiramento de ligação, energia de torção de ângulos e interações de átomos não-ligados, ângulos diedros, ligações hidrogênio, interações eletrostáticas, entre outros (COHEN, 1996; BARREIRO, RODRIGUES, 1997). Os métodos AMBER, CHARM, DISCOVER, MM2/MMP2, SYBIL, MMFF94, por exemplo, permitem a obtenção destes resultados (LEWARS, 2011). Outra característica deste tipo de metodologia é a obtenção de equações matemáticas que consideram apenas o núcleo dos átomos e não seus elétrons (CARVALHO *et al.*, 2003).

2. Mecânica quântica: tem como parâmetros equações da física quântica, que consideram os elétrons e núcleos dos átomos. Isto permite a obtenção de resultados com maior precisão (LEWARS, 2011; CARVALHO *et al.*, 2003). A mecânica quântica é subdividida em métodos *ab initio* e semiempíricos. A escolha do método depende do que se necessita, da capacidade e disponibilidade de máquina empregada para o cálculo, assim como do tamanho da molécula (PATRICK, 2008).

a) Métodos *ab initio*: são úteis para moléculas pequenas. O tempo de cálculo é maior, quando comparado com o semiempírico. Geram resultados considerados como mais precisos (CARVALHO *et al.*, 2003).

b) Métodos semiempíricos: são úteis para moléculas que possuem de 10 a 120 átomos. Constituem-se em simplificações dos métodos *ab initio* ao considerar apenas os elétrons de valência dos átomos. Dados experimentais são adicionados para melhor parametrização. Exemplos deste tipo de programas são: MINDO/3, MNDO, MNDO-d, PM3 e AM1 (PATRICK, 2008; CARVALHO *et al.*, 2003).

As moléculas, em geral, não são rígidas. As conformações das moléculas podem variar no vácuo, em líquidos e em cristais. Assim, considerando-se um ou mais destes sistemas, torna-se necessário calcular as possíveis conformações e deduzir qual é importante para as propriedades que serão avaliadas por modelagem molecular. Esta

avaliação pode ser realizada pela Análise Conformacional (COHEN, 1996; SANT'ANNA, 2002).

Na avaliação das conformações possíveis, em especial para moléculas contendo número razoável de ligações rotacionáveis, sistemas anelares saturados ou macromoléculas como proteínas, a Dinâmica molecular tem proporcionado bons resultados. Trata-se de simulação, que consiste na análise da movimentação dos átomos em uma molécula, átomos individuais ou moléculas em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de movimento de Newton ou da mecânica clássica (SANT'ANNA, 2002). Em geral, esta simulação em função do tempo se inicia a elevadas temperaturas para que ocorra melhor varredura do espaço conformacional (HÖLTJE, FOLKERS, 1997). Programas como o MOLSIM (LINSE, 2011) e GROMACS podem ser úteis para este propósito (SPOEL, MAAREN, CALEMAN, 2012).

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

O fato de ainda não se ter encontrado fármaco menos tóxico e de eficácia indiscutível para a doença de Chagas, sobretudo para a fase crônica da doença, tem estimulado a busca de novos quimioterápicos. Os fármacos utilizados na terapêutica, os nitrocompostos, mostram-se tóxicos e com elevada incidência de efeitos colaterais.

No Brasil e em outros países da Europa e da América, a leishmaniose constitui-se em problema de Saúde pública. Sua importância reside não somente na alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na capacidade de causar lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, além de provocar a morte, no caso de visceral, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo. As perspectivas de controle estão relacionadas com o vetor e desenvolvimento de novos fármacos eficazes para a patologia (DESJEUX, 2004).

Muitos produtos naturais revelam propriedades antiparasitárias que surpreendem quanto a eficácia e a seletividade. Tasdemir e colaboradores (2006), por exemplo, compararam com miltefosina a atividade *in vivo* de alguns flavonóides sobre cepas de *L. donovani*, contrastando com os resultados *in vitro*. Os resultados revelaram a nula inibição sobre o protozoário com o derivado 3-hidroxiflavona (Figura 14) e valor de

aproximadamente 15,4% para a quercetina (Figura 14), comparados com $96,62 \pm 0,88\%$ de inibição da miltefosina. A maioria dos flavonóides apresenta problemas físico-químicos, como pouca solubilidade. Por isso, são absorvidos, no entanto, o nível de absorção é geralmente muito baixo. Estudos sobre a farmacocinética demonstraram que a maioria dos compostos detectáveis no plasma, urina e bile são produtos de biotransformação, por exemplo, por glicosilação, metilação e sulfatação (WILLIAMSON *et al.*, 2005). Após o consumo oral de quercetina, um dos flavonóides mais comuns em plantas comestíveis, aglicona livre não é encontrada no plasma, mas seus conjugados são observados (MANACH, DONOVAN, 2004). Assim sendo, é necessário o planejamento de transportadores eficientes para estes compostos promissores a fim de promover seu uso na terapêutica (KAYSER, KIDERLEN, CROFT, 2003). Os dendrímeros podem ser úteis para este propósito.

FIGURA 14 – Estruturas dos flavonóides 3-hidroxiflavona e quercetina.

Face ao exposto e tendo em vista o caráter promissor de dendrímeros, o objetivo deste trabalho será sintetizar pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofural, 3-hidroxiflavona e quercetina potencialmente antichagásicos e leishmanicidas. Pretende-se obter a liberação controlada, toxicidade diminuída, aumento de eficácia, além de melhoria nas características físico-químicas, no caso dos flavonóides.

Os dendrímeros serão formados pelo inositol (foco central) e *dendrons* construídos com os compostos de atividade promissora -- NFOH, 3-hidroxiflavona e quercetina, através de etapas seguidas de esterificação. O inositol é um componente essencial envolvido em diferentes processos bioquímicos de mamíferos e de outros organismos vivos, por exemplo, protozoários patogênicos *Leishmania* ssp e *T. cruzi*. É, portanto, substância que tem histórico de participação no organismo, além de contribuir para o possível direcionamento do pró-fármaco para o parasita.

É importante ressaltar a importância da malha dendrímica ser composta com a substância ativa, permitindo o aumento exponencial do fármaco a cada geração do dendrímero (FERREIRA, GIAROLLA, 2007). Vale mencionar que em dissertação defendida, em 2007, por Giarolla efetuou-se estudo sobre as condições reacionais para obtenção dos derivados de NFOH. Com base nesse estudo, propôs-se a síntese dos derivados dendriméricos desse derivado nitrofurânico.

As estruturas dos pró-fármacos dendriméricos de primeira geração, propostos no trabalho, encontram-se apresentadas a seguir:

Dendrímero com 6 ramificações (geração 1):

Os pró-fármacos dendriméricos serão submetidos a estudo de modelagem molecular, sobretudo análise conformacional, que pode oferecer dados sobre a liberação dos compostos ativos a partir desses derivados. Objetivou-se, também, estudar, preliminarmente, a liberação enzimática, em laboratório dedicado a este

processo, durante estágio sanduíche no laboratório do Prof. Antony D'Emanuelle, na University of Central Lancashire, em Preston, Inglaterra.

O mecanismo de liberação dos dendrímeros propostos poderá compreender: a hidrólise dos ésteres ligados diretamente ao inositol, com hidrólise posterior do NFOH, 3-hidroxiflavona e quercetina do transportador maleílico, ou a hidrólise inicial das ramificações mais externas, até que os *dendrons* ligados diretamente ao centro, inositol, sejam liberados. De uma forma ou de outra, prevê-se a obtenção de pró-fármacos de liberação múltipla, ou em cascata, com toxicidade diminuída e aumento da eficácia.

É importante ressaltar que as reações de esterificação podem ocorrer em qualquer hidroxila livre da molécula de quercetina, podendo, nesse caso, prover mais ramificações com o ácido málico. Na estrutura, mostra-se apenas a OH na posição 3, como no caso da 3-hidroxiflavona.

Em adição, vale mencionar o aspecto altamente promissor de se utilizar o hidroximetilnitrofural nesse planejamento, considerando-se que ele já se mostrou mais ativo e menos tóxico que o protótipo, nitrofural, como mencionado anteriormente. Com o intuito de se conhecer a estabilidade desse derivado, o que auxilia a etapa sintética, objetivou-se, também, o desenvolvimento de estudo da respectiva foto e termoestabilidade, comparativamente ao protótipo, nitrofural.

MATERIAL E MÉTODOS

"EXPERIMENTOS SÃO OS ÚNICOS MEIOS DE CONHECIMENTO A NOSSA DISPOSIÇÃO,
O RESTO É POESIA, IMAGINAÇÃO".

M. PLANCK

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagentes e solventes

- ✓ Acetato de etila
- ✓ Acetonitrila
- ✓ Ácido acético
- ✓ Ácido clorídrico
- ✓ Ácido L-málico
- ✓ Ácido *p*-toluenossulfônico
- ✓ Água deuterada (D₂O)
- ✓ Álcool metílico
- ✓ Bicarbonato de sódio
- ✓ Carbonato de potássio
- ✓ 1,1'-Carbonildiimidazol (CDI)
- ✓ Cloroformato de etila
- ✓ Clorofórmio
- ✓ Clorofórmio deuterado (CDCl₃)
- ✓ Cloreto de sódio
- ✓ Dicicloexilcarbodiimida (DCC)
- ✓ Diclorometano
- ✓ 4-Dimetilaminopiridina (DMAP)
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO)
- ✓ Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆)
- ✓ 2,2-Dimetoxipropano
- ✓ Éter dietílico
- ✓ 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)
- ✓ Formaldeído 97%
- ✓ Hexano
- ✓ Hidróxido de sódio

- ✓ 3-Hidroxiflavona
- ✓ Inositol
- ✓ *N*-metil morfolina
- ✓ Nitrofural (NF)
- ✓ Quercetina
- ✓ Sulfato de sódio anidro
- ✓ Tetracloreto de carbono
- ✓ Tetraidrofurano (THF)

3.1.2 Equipamentos

- ✓ Agitadores magnéticos
- ✓ Câmara de fotoestabilidade Farma 424 CF Nova Ética
- ✓ Cromatógrafo Líquido Prominence (Shimadzu Co., Kyoto, JP) acoplado a espectrômetro de massas íon trap modelo HCT (Bruker Daltonics, MA, EUA), equipado com fonte electrospray, operada no modo alternado (positivo e negativo)
- ✓ Espectrofotômetro FTIR Bomem MB 100
- ✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advanced DPX-300
- ✓ Espectrofotômetro UV Beckam DU-70
- ✓ HPLC Shimadzu semipreparativo
- ✓ Rotaevaporador Büchi
- ✓ Sintetizador paralelo Büchi

3.1.3 Softwares para modelagem molecular

- ✓ Gaussian G03 (*Gaussian 03W for Windows*, version 6)
- ✓ HyperChem 7.51 (HyperChem Program Release 7 for Windows)
- ✓ MOLSIM 3.2. (DOHERTY, 1997)
- ✓ ViewerLite 4.2 (Accelrys Inc., 2001)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Modelagem Molecular (MM)

Os estudos de modelagem molecular foram realizados com a colaboração da Dra. Kerly F.M. Pasqualoto e da Professora Dra. Daniela Gonçalves Rando.

3.2.1.1 Estudos sobre a previsão da cisão dos pró-fármacos dendriméricos de primeira geração

As estruturas 3D dos dendrímeros de primeira geração construídos com inositol e uma, duas, três (GIAROLLA *et al.*, 2010), quatro, cinco ou seis ramificações (GIAROLLA *et al.*, 2011) contendo ácido L-málico e NFOH, 3-hidroxiflavona e quercetina em suas formas neutras foram construídas no programa HyperChem 7.51. As seguintes estruturas cristalografadas foram obtidas no PDB (*Protein Data Bank*) para serem utilizadas como padrões de geometria para as construções dos modelos com 3-hidroxiflavona, quercetina e NFOH: 2g0i (CADDICK *et al.*, 2006), 1e8W (resolução 2.50 Å) (WALKER *et al.*, 2000) e hg6183 (resolução 1.70 Å) (DORIGUETTO *et al.*, 2005), respectivamente.

A minimização de energia de cada modelo construído com o inositol e ramificações foi realizada utilizando mecânica molecular (MM+) nos programas HyperChem 7.51 e MOLSIM 3.2 (DOHERTY, 1997). Calcularam-se as cargas atômicas parciais no programa HyperChem 7.51 com o método semiempírico AM1 (DEWAR *et al.*, 1990). Os modelos com menores energias foram usados como estruturas iniciais para execução do passo seguinte, as simulações de dinâmica molecular (feitas com 2 ns, tamanhos de 0,001 ps, 300 K). Os arquivos das trajetórias foram salvos a cada 20 passos, resultando em 100.000 conformações para cada modelo. A constante dielétrica simula o ambiente de membranas biológicas e seu valor (3,5) foi considerado nos cálculos (TOKARSKI, HOPFINGER, 1997). O modelo de camada de hidratação proposto por Forsythe e Hopfinger (1973) foi utilizado para estimar a energia de solvatação, uma vez que o MOLSIM 3,2 não considera explícita moléculas de água durante as simulações dinâmica molecular. As contribuições energéticas de ligações

hidrogênio também foram calculadas. Selecionaram-se as conformações de menor energia de cada modelo a partir das simulações de dinâmica molecular (DM) e calcularam-se as cargas de potencial eletrostático (*ChelpG – Electrostatic Potential Charges*), utilizando método *ab initio* HF/6-31G* (Gaussian G03). O potencial eletrostático (PE) de cada modelo foi mapeado sobre a superfície de *Connolly*, utilizando escalas de colorações de -8.5 a 8.5 e⁻² (Gaussian G03). Representaram-se os valores negativos de potencial eletrostático (alta densidade eletrônica) em vermelho e os positivos, em azul (baixa densidade eletrônica). A energia do orbital molecular desocupado de menor energia (E_{LUMO}, do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) de cada modelo foi calculada e os mapas de superfícies foram gerados com variações nas colorações de -4.5 a 4.5 e⁻² (Gaussian G03). Valores negativos de distribuição eletrônica (alta densidade eletrônica) foram representados em vermelho e os positivos, em azul (baixa densidade eletrônica). O programa ViewerLite 4.2 (ViewerLite 4.2) foi utilizado para a visualização das ligações de hidrogênio de cada modelo.

3.2.1.2 Estudos de dinâmica molecular dos pró-fármacos dendriméricos de segunda geração

Assim como nos estudos de liberação, nos estudos de dinâmica molecular (DM) dos dendrímeros de segunda geração, as estruturas 3D foram construídas no programa HyperChem 7.51, utilizando os mesmos padrões de geometria provenientes do PDB. A otimização das geometrias dos modelos foi feita por mecânica molecular (MM+) e as cargas atômicas parciais, calculadas pelo método semi-empírico AM1 (DEWAR *et al.*, 1990). As minimizações de energia e as simulações de DM foram realizadas no programa MOLSIM 3.2 (DOHERTY, 1997). Os esquemas das simulações foram os seguintes:

- ✓ Dinâmica 1: 50 ps (50000 passos a cada 0.001 ps) a 50 K;
- ✓ Dinâmica 2: 50 ps (50000 passos a cada 0.001 ps) a 100 K;
- ✓ Dinâmica 3: 50 ps (50000 passos a cada 0.001 ps) a 200 K;
- ✓ Dinâmica 4: 100 ps (100000 passos a cada 0.001 ps) a 300 K;
- ✓ Dinâmica 5: 100 ps (100000 passos a cada 0.001 ps) a 310 K.

Arquivos trajetórias foram salvos a cada 20 passos, resultando 2500 conformações para as dinâmicas 1, 2 e 3 e 5000 conformações para as dinâmicas 4 e 5. Para cada esquema, o confôrmero de menor energia mínima da região de equilíbrio da DM foi selecionado, analisado estruturalmente, minimizado e utilizado como molécula de partida da simulação seguinte, bem como para o cálculo das contribuições de energia de ligação hidrogênio e de solvatação para obtenção da energia total do sistema. Dessa maneira, obtiveram-se modelos em cada temperatura e os respectivos valores de energia potencial total (E_{total}). Em adição, os números de ligações hidrogênios intramoleculares dos confôrmeros de menor energia foram visualizados no programa ViewerLite 4.2.

3.2.2 Síntese

Os estudos dos métodos sintéticos foram realizados com a colaboração com o Dr. Márcio H. Zaim, das mestrandas Soraya da Silva Santos e Andressa Polidoro e a aluna de iniciação científica Patrícia Sotelo.

3.2.2.1 Síntese do derivado hidroximetilnitrofural (NFOH) (TROSSINI *et al.*, 2010)

Esquema I - Síntese do derivado hidroximetilnitrofural.

A síntese do derivado hidroximetilnitrofural foi realizada em meio alcalino. Nitrofural (5×10^{-3} mol), K_2CO_3 ($7,5 \times 10^{-3}$ mol) e água (10 mL) foram misturados para compor o meio reacional. Formaldeído (18 mL) foi colocado em 2 etapas, 9 mL no início da reação e a outra metade após 3,5 horas. Manteve-se o sistema sob agitação e proteção da luz, por 7 horas. O produto foi lavado com metanol e recristalizado de metanol/água (6:0,1, v/v).

3.2.2.2 Síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila) acético (ácido málico protegido) (GREEN, KIDDLE, THOMPSON, 1995)

Esquema II – Síntese do ácido málico protegido.

Mantiveram-se sob agitação e à temperatura ambiente ácido L-málico, ácido *p*-toluenossulfônico e 2,2-dimetoxipropano nas proporções molares de $7,5 \times 10^{-3}$, $1,58 \times 10^{-4}$, $20,33 \times 10^{-3}$, respectivamente. Após tempo de 30 minutos, à temperatura ambiente, separaram-se 2 fases com água e diclorometano. Adicionou-se diclorometano e extraiu-se mais duas vezes a fase aquosa. As fases orgânicas foram reunidas e secadas sob sulfato de sódio anidro. O solvente foi retirado sob pressão reduzida, a 50 °C, e recristalizou-se o produto de clorofórmio/tetracloreto de carbono 1:1 (v/v).

3.2.2.3 Síntese dos dendrímeros de primeira geração

Para melhor compreensão das metodologias sintéticas, as estruturas dos intermediários dos métodos convergentes e divergentes, bem como dos dendrímeros de primeira e segunda geração podem ser visualizadas na Tabela V.

Tabela V: Intermediários de síntese e dendrímeros dos métodos convergente e divergente

Método Convergente		
Substância ativa	Intermediários e dendrímeros	
3-hidroxi flavona	<p><i>Intermediário I</i></p> <p>→ Produto de esterificação entre o ácido málico protegido e 3-hidroxi flavona</p>	<p><i>Intermediário II</i></p> <p>→ Desproteção do ácido málico</p>
	<p><i>Dendrímero I</i></p> <p>→ Dendrímero de primeira geração resultante da esterificação entre o Intermediário II e o inositol</p>	
Quercetina	<p><i>Intermediário III</i></p> <p>→ Produto de esterificação entre o ácido málico protegido e quercetina</p>	<p><i>Intermediário IV</i></p> <p>→ Desproteção do ácido málico</p>
	<p><i>Dendrímero III</i></p> <p>→ Dendrímero de primeira geração resultante da esterificação entre o Intermediário IV e o inositol</p>	

Tabela VI: Nomenclatura dos métodos sintéticos para obtenção de intermediários e dendrímeros pelo método convergente e divergente

Métodos	Objetivo
Método convergente	
1A a 3E	Síntese do intermediário I
4A a 7	Síntese do dendrímero I de primeira geração com 3-hidroxi flavona
8A a 9	Síntese do intermediário III
10A a 11	Síntese do dendrímero III de primeira geração com quercetina
Método divergente	
12A a 15	Síntese do intermediário V
16A e 16 B	Síntese do dendrímero IV de primeira geração com 3-hidroxi flavona
17	Síntese do dendrímero V de primeira geração com NFOH

3.2.2.3.1 Método convergente

✓ Síntese do intermediário I (3-hidroxi flavona e ácido málico protegido)

O esquema da metodologia sintética dos intermediários e respectivos dendrímeros com 3-hidroxi flavona, pelo método convergente, pode ser observado na Figura 15.

FIGURA 15: Síntese convergente com 3-hidroxi flavona.

Os reagentes, solventes, tempos totais de reações e referências utilizados na obtenção do intermediário I estão descritos na Tabela VII.

Tabela VII: Condições para obtenção do intermediário I

Métodos	Reagentes	Número de mol	Solvente Volume (mL)	Tempo total de reação (horas)	Referência
1A	-DCC -DMAP -AMP ¹ -3-hidroxi flavona	0,933x10 ⁻³ 0,0802x10 ⁻³ 0,754x10 ⁻³ 0,442x10 ⁻³	THF 10	48	Kim <i>et al.</i> , 2008
1B	-DCC -DMAP -AMP ¹ -3-hidroxi flavona	9,33x10 ⁻³ 8,02x10 ⁻⁴ 7,54x10 ⁻³ 4,42x10 ⁻³	THF 30	48	Dusting <i>et al.</i> , 2006
1C	-DCC -DMAP -AMP ¹ -3-hidroxi flavona	9,35x10 ⁻³ 7,84x10 ⁻⁴ 7,53x10 ⁻³ 4,41x10 ⁻³	THF 30	24	Dusting <i>et al.</i> , 2006
2A e 2B	-N-metil morfolina -Cloroformato de etila -AMP ¹ -3-hidroxi flavona	1,0x10 ⁻³ 1,0x10 ⁻³ 1,0x10 ⁻³ 1,0x10 ⁻³	Clorofórmio 16	22	Vargas, 2007
3A a 3E	-EDC -DMAP -AMP ¹ -3-hidroxi flavona	1,0x10 ⁻³ 1,0x10 ⁻⁴ 1,0x10 ⁻³ 1,0x10 ⁻³	THF 20	22	Adaptado de Damen <i>et al.</i> , 2000

¹ AMP: ácido málico protegido

O procedimento geral para obtenção do intermediário I pode ser observado no esquema III.

Esquema III – Síntese do intermediário I.

Métodos 1A, 1B, 1C

Adicionaram-se 3-hidroxi-flavona, DCC e DMAP em solução contendo o ácido málico protegido, em THF. A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente (Tabela VII). Adicionou-se água (50 µL-método 1A e 1 mL para os demais) e a solução foi mantida sob agitação por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 10 mL (método 1A) e 30 mL (demais métodos) de éter dietílico. O conteúdo reacional foi filtrado e o filtrado concentrado sob pressão reduzida.

Acompanhou-se a reação por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (1:1, v/v).

Métodos 2A e 2B

Adicionou-se, a 0 °C, solução de *N*-metil morfolina em clorofórmio (4 mL) à solução ácido málico protegido em clorofórmio (6 mL). Agitou-se, por 15 minutos, nesta temperatura e, então, colocou-se cloroformato de etila solubilizado em clorofórmio (4 mL). Manteve-se a agitação por mais 30 minutos. Em seguida, adicionou-se solução de 3-hidroxi-flavona em clorofórmio (6 mL). Agitou-se o sistema por 1 hora a 0 °C e por 22 horas à temperatura ambiente (Tabela VII). Após esse período, diluiu-se a mistura reacional com clorofórmio (50 mL) e lavou-se, subsequentemente, com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M (2 x 10 mL), solução aquosa saturada de cloreto de sódio (10 mL), solução aquosa de ácido clorídrico 1 M (2 x 10 mL) e, novamente, com solução aquosa saturada de cloreto de sódio (10 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente rotaevaporado.

Acompanharam-se as reações com CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (1:1, v/v).

Métodos 3A a 3E

Mantiveram-se sob agitação e em banho de gelo, ácido málico protegido e EDC em THF. Após 30 minutos, adicionaram-se 3-hidroxi-flavona e DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela VII). Após este período, adicionaram-se 50 mL de acetato de etila no meio reacional. Em seguida,

realizaram-se três extrações com 50 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 50 mL de água e 50 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica sob sulfato de sódio anidro. Na sequência, o solvente foi rotaevaporado.

Acompanharam-se as reações com CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (1:1, v/v).

✓ *Síntese do intermediário II (desproteção do ácido málico)*

O procedimento geral para obtenção do intermediário II pode ser observado no esquema IV.

Esquema IV – Síntese do intermediário II.

Desproteção com ácido acético, THF e água (DAMEN *et al.*, 2000)

Dissolveu-se o intermediário I obtido nos métodos 1A, 1B, 1C, 2B, 3A e 3B em solução de ácido acético, THF e água (1:1:1, v/v/v). A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 24 horas. Posteriormente, os solventes foram retirados, sob pressão reduzida, a, aproximadamente, 80 °C.

Desproteção com solução de ácido clorídrico 1 M (adaptado de MANTELL, 2007)

Dissolveu-se o intermediário I obtido pelos métodos 3C e 3E em:

- HCl 1 M;
- Solução de HCl 1 M e acetonitrila (1:1, v/v);
- Solução de HCl 1 M e THF (1:1, v/v).

A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 24 horas. Posteriormente, os solventes foram retirados sob pressão reduzida, a, aproximadamente, 80 °C.

✓ *Síntese do dendrímero I (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e 3-hidroxiflavona)*

Os reagentes, solventes, tempos totais de reações e referências utilizados na obtenção do dendrímero I estão descritos na Tabela VIII.

Tabela VIII: Condições para obtenção do dendrímero I

Métodos	Reagentes	Número de mol	Solvente Volume (mL)	Tempo total de reação (horas)	Referência
4A	-DCC -DMAP -intermediário II ¹ -inositol	$7,16 \times 10^{-3}$ $6,16 \times 10^{-4}$ $5,75 \times 10^{-3}$ $3,37 \times 10^{-3}$	THF 30	48	Dusting <i>et al.</i> , 2006
5A	-EDC -DMAP -intermediário II ¹ -inositol	$8,03 \times 10^{-4}$ $8,03 \times 10^{-5}$ $8,03 \times 10^{-4}$ $1,33 \times 10^{-4}$	THF 20	24	Assafa, Katzhendlerb, Haj-Yehiaa, 2000
5B	-EDC -DMAP -intermediário II ¹ -inositol	$2,82 \times 10^{-4}$ $2,82 \times 10^{-5}$ $2,82 \times 10^{-4}$ $2,82 \times 10^{-4}$	THF 100	72	Assafa, Katzhendlerb, Haj-Yehiaa, 2000
6	-N-metil morfolina -Cloroformato de etila -intermediário II ¹ -inositol	$2,82 \times 10^{-4}$ $2,82 \times 10^{-4}$ $2,82 \times 10^{-4}$ $2,82 \times 10^{-4}$	Clorofórmio 4	50	Vargas, 2007
7	-CDI -DMAP -intermediário II ¹ -inositol	$5,65 \times 10^{-4}$ $5,65 \times 10^{-5}$ $5,65 \times 10^{-4}$ $5,65 \times 10^{-4}$	THF 100	48	Hussain, Liebert, Heinze, 2004; Aboussafy, 2010

¹ Intermediário II: Produto resultante da desproteção do ácido málico protegido

O procedimento geral para obtenção do dendrímero de primeira geração com 3-hidroxiflavona (dendrímero 1) pode ser observado no esquema V.

Equema V – Síntese do dendrímero de primeira geração com 3-hidroxiflavona.

Método 4A

Adicionaram-se inositol, DCC e DMAP em solução contendo o intermediário II (que teve como material de partida o intermediário I obtido em 1C) em THF. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela VIII). Os volumes de solventes e tempos totais de reações estão descritos na Tabela VIII. Adicionou-se água (1 mL) e manteve-se a solução sob agitação por 10 minutos. Em seguida, juntaram-se 10 mL (método 4A) e 30 mL (métodos 4B e 4C) de éter dietílico. O conteúdo reacional foi filtrado e o filtrado concentrado sob pressão reduzida.

Acompanhou-se a reação por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (2:1, v/v).

Método 5A e 5B

Mantiveram-se sob agitação e em banho de gelo o intermediário II (que teve como material de partida o intermediário I obtido em: 3C e 3E) e EDC em THF. Após 30 minutos, adicionaram-se inositol e DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela VIII). Após este período, as extrações foram realizadas da seguinte maneira:

- Método 5A: adicionaram-se 50 mL de acetato de etila no meio reacional. Em seguida, realizaram-se três extrações com 50 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 50 mL de água e 50 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica sob sulfato de sódio anidro. Na sequência, o solvente foi rotaevaporado.

- Método 5B: adicionaram-se 100 mL de acetato de etila no meio reacional. Em seguida, realizaram-se três extrações com 70 mL de água. Secou-se a fase orgânica sob sulfato de sódio anidro. Na sequência, o solvente foi rotaevaporado.

Acompanharam-se as reações com CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (2:1, v/v).

Métodos 6

Adicionou-se, a 0 °C, solução de *N*-metil morfolina em clorofórmio (1 mL) à solução do intermediário II (que teve como material de partida o intermediário I obtido em 3E) em clorofórmio (1 mL). Agitou-se, por 15 minutos, nesta temperatura e, então, se juntou cloroformato de etila solubilizado em clorofórmio (1 mL). Manteve-se a agitação por mais 30 minutos. Em seguida, adicionou-se solução de inositol em clorofórmio (1 mL). Agitou-se o sistema por 1 hora a 0 °C e, em seguida, à temperatura ambiente (Tabela VIII). Após esse período, diluiu-se a mistura reacional com clorofórmio (50 mL) e lavou-se, subsequentemente:

- Método 6A: solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M (2 x 10 mL), solução aquosa saturada de cloreto de sódio (10 mL), solução aquosa de ácido clorídrico 1 M (2 x 10 mL) e novamente com solução aquosa saturada de cloreto de sódio (10 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente rotaevaporado.

- Método 6B: adicionaram-se 100 mL de acetato de etila no meio reacional e realizaram-se três extrações com 70 mL de água. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente rotaevaporado.

Acompanharam-se ambas as reações com CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (2:1, v/v).

Método 7

Mantiveram-se sob agitação, em banho de gelo e atmosfera de argônio, o intermediário II (que teve como material de partida o intermediário I obtido em 3E) e CDI em THF tratado. Após 30 minutos, adicionaram-se inositol e DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela VIII). Após este período, adicionaram-se 100 mL de acetato de etila e realizaram-se três extrações com 70 mL

de água cada. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente rotaevaporado.

Acompanhou-se a reação com CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (2:1, v/v).

✓ *Síntese do intermediário III (quercetina e ácido málico protegido)*

O esquema da metodologia sintética dos intermediários e respectivos dendrímeros com quercetina, pelo método convergente, pode ser observado na Figura 16.

FIGURA 16: Esquema da metodologia sintética do método convergente com quercetina.

Os reagentes, solventes, tempos totais de reações e referências utilizados na obtenção do intermediário III estão descritos na Tabela XIX.

Tabela XIX: Reações para obtenção do intermediário III

Métodos	Reagentes	Número de mol	Solvente Volume (mL)	Tempo total de reação (horas)	Referência
8A	-DCC -DMAP -AMP ¹ -quercetina	2,8x10 ⁻³ 2,4x10 ⁻⁴ 2,26x10 ⁻³ 0,442x10 ⁻³	THF 10	22	Dusting <i>et al.</i> , 2006
8B	-DCC -DMAP -AMP ¹ -quercetina	7,16x10 ⁻³ 6,16x10 ⁻⁴ 5,75x10 ⁻³ 3,37x10 ⁻³	THF 30	24	Dusting <i>et al.</i> , 2006
8C	-DCC -DMAP -AMP ¹ -quercetina	0,028 2,4x10 ⁻³ 0,023 4,42x10 ⁻³	THF 20	22	Assafa, Katzhendlerb, Haj-Yehiaa, 2000
9	-EDC -DMAP -AMP ¹ -quercetina	1,00x10 ⁻³ 1,00x10 ⁻⁴ 1,00x10 ⁻³ 1,00x10 ⁻³	THF	0,5	Assafa, Katzhendlerb, Haj-Yehiaa, 2000

¹ AMP: ácido málico protegido

O procedimento geral para obtenção do intermediário III pode ser observado no esquema VII.

Esquema VII – Síntese do intermediário III.

Métodos 8A, 8B e 8C

Adicionaram-se quercetina, DCC e DMAP em solução contendo o ácido málico protegido, em THF. Manteve-se a mistura reacional sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela XIX). Adicionou-se água (1 mL) e a solução foi mantida sob agitação

por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 30 mL de éter dietílico. O conteúdo reacional foi filtrado e o filtrado concentrado sob pressão reduzida.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (1:2, v/v).

Método 9

Mantiveram-se sob agitação e em banho de gelo o ácido málico protegido e EDC em THF. Após 30 minutos, adicionaram-se quercetina e DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela XIX). Após este período, adicionaram-se 80 mL de acetato de etila no meio reacional. Em seguida, realizaram-se três extrações com 50 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 50 mL de água e 50 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica sob sulfato de sódio anidro. Na sequência, o solvente foi rotaevaporado.

Acompanhou-se a reação com CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (1:2, v/v).

✓ Síntese do intermediário IV (desproteção do ácido málico)

O procedimento para obtenção do intermediário IV pode ser observado no esquema VIII.

Esquema VIII – Síntese do intermediário IV.

Dissolveu-se o intermediário III (obtido nos métodos 8B, 8C e 9) em solução de ácido acético, THF e água (1:1:1, v/v/v). A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 24 horas. Posteriormente, os solventes foram retirados sob

pressão reduzida, a, aproximadamente, 80 °C. Após a retirada do solvente, o produto foi lavado com água, acetato de etila e diclorometano, com 5 mL de cada solvente.

✓ *Síntese do dendrímero III (contendo inositol, ácido L-málico e quercetina)*

Os reagentes, solventes, tempos totais de reações e referências utilizados na obtenção do dendrímero III estão descritos na Tabela X.

Tabela X: Condições para obtenção do dendrímero III

Métodos	Reagentes	Número de mol	Solvente Volume (mL)	Tempo total de reação (horas)	Referência
10	-DCC -DMAP -intermediário IV ¹ -inositol	0,0155 1,65x10 ⁻³ 0,0125 1,44x10 ⁻³	THF 30	48	Dusting <i>et al.</i> , 2006
11	-EDC -DMAP -intermediário IV ¹ -inositol	1,18x10 ⁻³ 1,18x10 ⁻⁴ 1,18x10 ⁻³ 1,97x10 ⁻⁴	THF 20	24	Assafa, Katzhendlerb, Haj-Yehiaa, 2000

¹ Intermediário IV: produto de desproteção do ácido málico protegido

O procedimento geral para obtenção do dendrímero de primeira geração de quercetina (dendrímero III) pode ser observado no esquema IX.

Esquema IX – Síntese do dendrímero de primeira geração de quercetina.

Método 10

Adicionaram-se inositol, DCC e DMAP em solução contendo o intermediário IV (que teve como material de partida o intermediário III obtido em 8B), em THF. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela X). Juntou-se água (1 mL) e a solução foi mantida sob agitação por 10 minutos. Em seguida,

juntaram-se 30 mL de éter dietílico. O conteúdo reacional foi filtrado e o filtrado concentrado sob pressão reduzida.

Acompanhou-se a reação por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (1:2, v/v).

Método 11

Mantiveram-se sob agitação e em banho de gelo o intermediário IV (que teve como material de partida o intermediário III obtido em 9) e EDC em THF. Após 30 minutos, adicionaram-se inositol e DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela X). Após este período, adicionaram-se 80 mL de acetato de etila no meio reacional. Em seguida, realizaram-se três extrações com 50 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 50 mL de água e 50 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica sob sulfato de sódio anidro. Na sequência, o solvente foi rotaevaporado.

Acompanhou-se a reação com CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (1:2, v/v).

3.2.2.3.2 Método divergente

O esquema da metodologia sintética dos intermediários e respectivos dendrímeros do método divergente pode ser observado na Figura 17.

FIGURA 17: Esquema da metodologia sintética do método divergente.

✓ Síntese do intermediário V (inositol e ácido málico protegido)

Os reagentes, solventes, tempos totais de reações e referências utilizados na obtenção do intermediário V estão descritos na Tabela XI.

Tabela XI: Condições para obtenção do intermediário V

Métodos	Reagentes	Número de mol	Solvente Volume (mL)	Tempo total de reação (horas)	Referência
12A, 12B, 12C	-DCC -DMAP -AMP ¹ -inositol	5,75x10 ⁻³ 5,75x10 ⁻⁴ 5,75x10 ⁻³ 9,58x10 ⁻⁴	THF 30	4	Adaptado de Damen <i>et al.</i> , 2000
12D	-DCC -DMAP -AMP ¹ -inositol	0,017 1,70x10 ⁻⁴ 0,017 2,89x10 ⁻³	THF 30	24	Adaptado de Damen <i>et al.</i> , 2000
13A	-EDC -DMAP -AMP ¹ -inositol	5,75x10 ⁻³ 5,75x10 ⁻⁴ 5,75x10 ⁻³ 9,58x10 ⁻⁴	DMSO 20	4	Adaptado de Damen <i>et al.</i> , 2000
13B	-EDC -DMAP -AMP ¹ -inositol	1,00x10 ⁻³ 0,02x10 ⁻³ 1,00x10 ⁻³ 1,00x10 ⁻³	Diclorometano 30	27	Kim <i>et al.</i> , 2008
13C	-EDC -DMAP -AMP ¹ -inositol	2,00x10 ⁻³ 1,00x10 ⁻³ 1,67x10 ⁻⁴ 1,00x10 ⁻³	DMSO 20	24	Kim <i>et al.</i> , 2008
14A e 14B	-CDI -AMP ¹ -inositol	2,00x10 ⁻³ 1,00x10 ⁻³ 1,67x10 ⁻⁴	THF 35	24	Sen, Anliker, 1996
14C	-CDI -DMAP -AMP ¹ -inositol	5,75x10 ⁻³ 5,75x10 ⁻⁴ 5,75x10 ⁻³ 9,57x10 ⁻⁴	THF 30	24	Hussain, Liebert, Heinze, 2004; Aboussafy, 2010

¹ AMP: ácido málico protegido

O procedimento geral para obtenção do intermediário V pode ser observado no esquema X.

Esquema X – Síntese do intermediário V.

Métodos 12A, 12B e 12C

Em banho de gelo, mantiveram-se sob agitação e em THF, ácido málico protegido e agente condensante DCC. Após 30 minutos, adicionaram-se inositol e DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela XI). Filtrou-se o conteúdo reacional. No filtrado adicionaram-se 156 mL de acetato de etila. A extração foi realizada em etapas, com 69 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 69 mL de água e 69 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi secada sob sulfato de sódio anidro. Posteriormente, retirou-se o solvente por rotaevaporação.

Acompanhou-se a reação por CCD, com fase móvel metanol/clorofórmio (19:1, v/v).

Método 12D

Adicionaram-se inositol, DCC e DMAP em solução contendo o ácido málico protegido, em THF. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela XI). Adicionou-se água (1 mL) e a solução foi mantida sob agitação por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 30 mL de éter dietílico. O conteúdo reacional foi filtrado e o filtrado concentrado sob pressão reduzida.

Acompanhou-se a reação por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (2:1, v/v).

Método 13A

Mantiveram-se sob agitação, à temperatura ambiente e em DMSO, ácido málico protegido e agente condensante EDC. Após 30 minutos, adicionaram-se inositol e DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela XI). Após este período, adicionaram-se 100 mL de acetato de etila no meio reacional. Em seguida, adicionaram-se 100 mL de água. Realizaram-se três extrações com, aproximadamente, 150 mL de acetato de etila cada. A porção aquosa foi reservada. A fase orgânica foi lavada três vezes com aproximadamente 300 mL de água. Após este procedimento, secou-se a fase orgânica sob sulfato de sódio anidro. Na sequência, o solvente foi rotaevaporado.

Método 13B

Em solução de 10 mL de ácido málico protegido em diclorometano adicionou-se solução de 10 mL de EDC e DMAP em diclorometano. O sistema reacional foi mantido sob agitação por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após este período, juntou-se solução de 10 mL de inositol em diclorometano. Após 2 h e 30 min de reação, o sistema foi aquecido a 41 °C (Tabela XI). Realizou-se a extração com a adição inicial de 50 mL de acetato de etila e 50 mL de água. Lavou-se a fase aquosa com três porções de 50 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi secada sob sulfato de sódio anidro e, posteriormente, o solvente foi rotaevaporado.

Acompanhou-se a reação por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol (19:1, v/v).

Método 13C

A reação foi realizada com DMSO, à temperatura ambiente. O procedimento foi o mesmo que o descrito para o método 2B (Tabela XI). A diferença entre as metodologias está na extração. Neste caso, adicionaram-se 100 mL de água no sistema e a extração ocorreu com três porções de acetato de etila (100 mL cada). Na fase orgânica, realizaram-se sucessivas extrações com água para total retirada do DMSO. A porção

orgânica foi secada sob sulfato de sódio anidro e, posteriormente, o solvente foi retirado por rotaevaporação.

Acompanhou-se a reação por CCD, com fase móvel metanol/clorofórmio (19:1, v/v).

Métodos 14A e 14B

A reação iniciou-se a partir de solução de ácido málico protegido em THF. Adicionou-se, em seguida, a solução formada por CDI e THF. Após 5 minutos, adicionou-se o inositol (Tabela XI). O sistema reacional foi mantido sob agitação e as temperaturas variaram segundo o método:

→14A: a reação foi mantida à temperatura ambiente.

→14B: a reação foi mantida a 68 °C.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel metanol/clorofórmio (19:1, v/v).

Método 14C

Em atmosfera de argônio, agitou-se, por 30 minutos, ácido málico protegido e CDI em THF tratado. Após este período, foram adicionados inositol e DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela XI). Em seguida, acrescentaram-se 70 mL de acetato de etila e o volume final foi dividido em 2 partes. As extrações foram feitas da seguinte maneira:

- Parte 1: 50 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 50 mL de água e 50 mL de solução saturada de cloreto de sódio. O solvente orgânico foi secado com sulfato de sódio anidro e, posteriormente, rotaevaporado.

- Parte 2: solução HCl 0,05 M. O solvente orgânico foi secado com sulfato de sódio anidro e, posteriormente, rotaevaporado.

A reação foi acompanhada com CCD, fase móvel clorofórmio/metanol (2:1, v/v).

✓ Síntese do intermediário VI (inositol e ácido L-málico)

O procedimento geral para obtenção do intermediário VI pode ser observado no esquema XI.

Esquema XI – Síntese do intermediário VI.

Desproteção com ácido acético, THF e água (DAMEN *et al.*, 2000)

Dissolveu-se o intermediário V (obtido no método 12A, 12C, 12D) em solução de ácido acético, THF e água (1:1:1, v/v/v). A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 24 horas. Posteriormente, os solventes foram retirados sob pressão reduzida, a, aproximadamente, 80 °C. Após a retirada do solvente, o produto foi lavado com água, acetato de etila e diclorometano, com 5 mL de cada solvente.

✓ Síntese do dendrímero IV (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e 3-hidroxiflavona)

Os reagentes, solventes, tempos totais de reações e referências utilizados na obtenção do dendrímero IV estão descritos na Tabela XII.

Tabela XII: Condições para obtenção do dendrímero IV

Métodos	Reagentes	Número de mol	Solvente Volume (mL)	Tempo total de reação (horas)	Referência
16A	-DCC	$3,38 \times 10^{-4}$	THF 15	52	Adaptado de Damen <i>et al.</i> , 2000
	-DMAP	$3,38 \times 10^{-5}$			
	-Intermediário VI ¹	$3,38 \times 10^{-4}$			
	-3-hidroxiflavona	$2,03 \times 10^{-3}$			
16B	-DCC	$0,933 \times 10^{-3}$	THF 10	24	Dusting <i>et al.</i> , 2006
	-DMAP	$0,0802 \times 10^{-3}$			
	-Intermediário VI ¹	$0,754 \times 10^{-3}$			
	-3-hidroxiflavona	$0,442 \times 10^{-3}$			

¹ Intermediário VI: produto de desproteção do ácido málico protegido

O procedimento geral para obtenção do dendrímero IV pode ser observado no esquema XII.

Esquema XII – Síntese do dendrímero de primeira geração com 3-hidroxiflavona.

Método 16A

Em banho de gelo, mantiveram-se sob agitação e em THF o intermediário VI (que teve como material de partida o intermediário V obtido em 12D e agente condensante DCC. Após 30 minutos, adicionaram-se a 3-hidroxiflavona e o DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela XII). Filtrou-se o conteúdo reacional. No filtrado, adicionaram-se 35 mL de acetato de etila. A extração foi realizada em etapas, com 25 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 25 mL de água e 25 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica sob sulfato de sódio anidro. Posteriormente, o solvente foi retirado por rotaevaporação.

Acompanhou-se reação por CCD, com fase móvel metanol/clorofórmio (19:1, v/v).

Método 16B

Adicionaram-se 3-hidroxiflavona, DCC e DMAP em solução contendo o intermediário VI (que teve como material de partida o intermediário V obtido em 12D), em THF. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente (Tabela XII). Água (50 µL) foi adicionada e a solução, mantida sob agitação por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 10 mL de éter dietílico. O conteúdo reacional foi filtrado e o filtrado concentrado sob pressão reduzida.

Acompanhou-se a reação por CCD, com fase móvel metanol/clorofórmio (19:1, v/v).

✓ *Síntese do dendrímero V (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e NFOH)*

O procedimento geral para obtenção do dendrímero V pode ser observado no esquema XIII (método 17).

Esquema XIII – Síntese do dendrímero de primeira geração com NFOH.

O intermediário VI (que teve como material de partida o intermediário V obtido em 12D), NFOH, DCC e DMAP foram adicionados em 50 mL de THF. As proporções molares dos reagentes foram de 6:1:0,1:1 (mol/mol/mol/mol), respectivamente. A mistura reacional foi submetida à agitação por tempo por 45 horas. A extração foi realizada em etapas, com 25 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 25 mL de água e 25 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Secou-se a fase orgânica sob sulfato de sódio anidro. Posteriormente, o solvente foi retirado por rotaevaporação.

Acompanhou-se a reação com CCD, fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético (85:10:5 v/v/v).

3.2.3 Tentativas de purificação dos dendrímeros de primeira geração de 3-hidroxiavona e quercetina resultantes do método convergente e intermediário de síntese do método divergente

3.2.3.1 Cromatografia preparativa

Os testes para a escolha das melhores fases móveis dos sistemas cromatográficos foram realizados em cromatoplasmas de sílica-gel G-60, Merck. Os produtos analisados foram os dendrímeros de primeira geração de 3-hidroxiavona (resultante do método 4A) e de quercetina (10A).

As cromatografias preparativas foram preparadas em placas de vidro contendo sílica-gel 60 GF, Merck. Resumidamente, fez-se uma suspensão da sílica em água que, posteriormente, foi colocada na placa com ajuda de um equipamento espalhador. As placas foram secadas e ativadas em temperaturas próximas a 110 °C por 3 horas e reveladas em câmaras de luz ultravioleta.

3.2.3.2 Recristalização

Cerca de 10 mg do dendrímero de primeira geração de quercetina (produto final do 10A) foram solubilizados e a recristalização foi efetuada com misturas de solventes na tentativa de obtenção de compostos puros. Os ensaios a quente foram feitos com temperaturas próximas a 50 °C e aqueles a frio, em banho de gelo.

Entre os testes, os precipitados foram filtrados sob pressão reduzida.

3.2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Foram efetuadas em equipamento para CLAE, semipreparativo, marca Shimadzu, na FCF-USP.

Ácido málico, ácido málico protegido, provável DCU, DCC, quercetina, 3-hidroxiavona e os dendrímeros de primeira geração com 3-hidroxiavona e quercetina resultante do método 4A, e de quercetina 10A, foram solubilizados em fase móvel. A coluna cromatográfica empregada foi C₁₈ e o detector do tipo UV. Os comprimentos de

onda utilizados foram os correspondentes aos observados previamente em espectrofotômetro de UV.

3.2.3.4 Cromatografia em coluna

Os testes para a escolha da melhor fase móvel para o sistema cromatográfico foram feitos em cromatoplasas de sílica-gel G-60, Merck.

A cromatografia em coluna foi, também, realizada em sílica-gel *mesh* 70-230 utilizando-se as seguintes fases móveis:

- Intermediário I obtido no método 2B: fase móvel hexano/acetato de etila (gradiente de concentração).
- Intermediário V obtido pelos métodos 12B: fase móvel clorofórmio/metanol 19:1, v/v.
- Intermediário VI obtido a partir do método 12D: acetato de etila/hexano 1:1, v/v.

3.2.3.5 Membrana de diálise

Cerca de 0,20 g do produto obtido pelo método 10A foi submetido à purificação por membrana de diálise (2000 da). A amostra ficou sob agitação, submersa em água, à temperatura ambiente, por 3 dias.

3.2.4 Estudos de fotoestabilidade do NF e NFOH

Estes estudos foram realizados com a colaboração do Professor Dr. Humberto Gomes Ferraz, do Departamento de Farmácia da FCF-USP, e de técnico e doutorando Felipe Augusto Dörr, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP.

Os procedimentos de fotodegradação foram efetuados em câmara de fotoestabilidade, sob condições luminosas de: lâmpada branca fluorescente fria similar à ISO 10977(1993) e lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320 nm e 400 nm e emissão máxima de energia entre 350 nm e 370 nm (ICH, 1996).

Analisou-se a fotoestabilidade do NF e NFOH em solução água/metanol (1:1, v/v), em concentração de 10 µg/mL. Adicionaram-se as soluções em cubeta de quartzo, fechadas hermeticamente. As cubetas foram colocadas na câmara de fotoestabilidade por tempos determinados, de 0-60 min, à temperatura de 25 °C ± 0,5 °C. Manteve-se o controle protegido da luz durante todo o teste.

O perfil de fotodegradação foi analisado em Cromatógrafo Líquido Prominence em coluna: Luna C₁₈(2) 3 µm 150 x 2,0 mm (Phenomenex, EUA), com fase móvel água e metanol, vazão: 200 µL/min, gradiente de concentração.

3.2.5 Métodos Analíticos

3.2.5.1 Espectrofotometria no infravermelho (IV)

A espectrofotometria no IV foi realizada no equipamento FTIR Bomem MB100 da Central Analítica, IQ USP, com pastilhas de KBr.

3.2.5.2 Espectrofotometria no ultravioleta (UV)

A espectrofotometria no UV foi realizada no equipamento Espectrofotômetro Beckman DU-70, da FCF-USP.

3.2.5.3 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e de ¹³C

As análises de RMN foram efetuadas em espectro Bruker 300 MHz, modelo Advanced DPX-300 da FCF-USP.

3.2.6 Cromatografia

3.2.6.1 Em camada delgada (CCD)

Utilizaram-se cromatoplaques de sílica-gel G-60, Merck, para acompanhamento das reações, com fases móveis apropriadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O CAMINHO DA SABEDORIA ? É SIMPLES : ERRAR, ERRAR E ERRAR NOVAMENTE, MAS
MENOS, MENOS E MENOS.

PIET HEIN

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MODELAGEM MOLECULAR

4.1.1 Estudos sobre a previsão da cisão dos pró-fármacos dendriméricos de primeira geração

Neste trabalho, utilizou-se a modelagem molecular como nova abordagem para melhor compreensão, e consequente previsão, sobre a desmontagem das ramificações a partir do foco central do dendrímero planejado. Para isto, construíram-se modelos com inositol com uma, duas, três (GIAROLLA *et al.*, 2010), quatro, cinco e seis ramificações (GIAROLLA *et al.*, 2011). Vale ressaltar que estas estruturas provavelmente serão liberadas por ação enzimática, mais especificamente através de esterases inespecíficas. Essas enzimas poderiam atuar em dois pontos das ramificações: (1) sobre carbono carbonílico que está próximo do inositol (C_1) e (2) sobre o que está mais próximo do composto ativo (C_2). As representações esquemáticas dos modelos estudados podem ser visualizadas na Figura 18.

FIGURA 18 – Representação esquemática dos modelos estudados em modelagem molecular.

Quatro aspectos principais foram analisados neste trabalho. O primeiro deles foi a distribuição espacial dos dois carbonos carbonílicos. Este fator foi importante para fornecer conclusões relacionadas à disponibilidade destes grupos para a aproximação e, conseqüentemente, ação de esterases inespecíficas. Em adição, estudaram-se a densidade eletrônica e a E_{LUMO} destes carbonos. Estas características foram relevantes na análise da suscetibilidade destes carbonos a um ataque nucleofílico enzimático. Os estudos das ligações de hidrogênio foram de fundamental importância nas avaliações das interações entre as ramificações e estabilidade dos modelos.

Na Tabela XIII, podem-se observar a energia total (E_{total}), número de ligações de hidrogênio e E_{LUMO} dos dendrímeros contendo de uma a seis ramificações com 3-hidroxiavona, quercetina e NFOH.

E_{total} corresponde à soma de todas as contribuições de energia de cada modelo, tais como: energias de estiramento, de flexão, de torção, de interação do tipo 1-4 (Lennard-Jones), de interação de van der Waals, de interação eletrostática, de ligação de hidrogênio e de solvatação. Em geral, quanto mais negativo é o valor E_{total} , mais energeticamente favorável está o sistema. Sistemas flexíveis (com maior grau de liberdade) tendem a apresentar valores mais elevados de E_{total} .

Tabela XIII – Parâmetros determinados para os dedrimeros com uma a seis ramificações com 3-hidroxiflavona, quercetina e NFOH

Dendrímtero	E _{total} (kcal/mol)	Números de ligações de hidrogênio	E _{LUMO} (kcal/mol)
1 ramificação			
3-hidroxiflavona	-16,73	2	1,13
quercetina	-92,73	1	1,06
NFOH	-53,29	-	-0,28
2 ramificações			
3-hidroxiflavona	16,00	2	0,08
quercetina	-110,48	4	0,64
NFOH	-116,15	5	-0,37
3 ramificações			
3-hidroxiflavona	0,94	4	0,51
quercetina	-164,76	5	0,48
NFOH	-218,11	11	-0,69
4 ramificações (modelo A)			
3-hidroxiflavona	82,10	4	0,64
quercetina	-257,65	5	0,30
NFOH	-215,59	11	-0,87
4 ramificações (modelo B)			
3-hidroxiflavona	87,63	2	0,97
quercetina	-242,29	8	0,74
NFOH	-341,44	11	-0,90

Tabela XIII – Parâmetros determinados para os dedrimeros com uma a seis ramificações com 3-hidroxi flavona, quercetina e NFOH (cont.)

Dendrímtero	E_{total} (kcal/mol)	Números de ligações de hidrogênio	E_{LUMO} (kcal/mol)
5 ramificações			
3-hidroxi flavona	116,10	7	0,82
quercetina	-390,95	7	0,27
NFOH	-420,27	13	-0,80
6 ramificações			
3-hidroxi flavona	151,62	5	0,49
quercetina	-400,03	13	0,36
NFOH	-482,24	13	-0,83

Os dendrimeros planejados com duas, três, quatro (modelos A e B), cinco e seis ramificações contendo 3-hidroxi flavona não foram considerados neste trabalho, pois apresentaram valores positivos de E_{total} (16, 0,94, 82,10, 87,63, 116,10, 151,62 kcal/mol, respectivamente). Por outro lado, todos os compostos contendo quercetina e NFOH mostraram-se energeticamente favoráveis. Ligações de hidrogênio intramoleculares possivelmente contribuíram para esta estabilidade energética, por exemplo, a ausência destas interações no dendrímtero com uma ramificação contendo NFOH pode ter sido responsável pelo seu maior valor de E_{total} , quando comparado ao dendrímtero correspondente de quercetina. Em adição, os modelos com quatro (modelo B), cinco e seis ramificações e NFOH foram mais energeticamente favoráveis que seus correspondentes planejados com quercetina. Os dendrimeros com seis ramificações foram os mais estáveis (E_{total} quercetina = -400,03 kcal/mol e NFOH = -482,24 kcal/mol).

A E_{LUMO} representa a reatividade eletrônica de uma molécula. Quanto menor for esta energia, maior a habilidade do sistema em atuar como eletrófilo (IUPAC, 2006). Neste contexto, todos os dendrimeros contendo NFOH apresentaram os menores

valores de E_{LUMO} , quando comparados às moléculas similares planejadas com quercetina (Tabela XIII).

Os mapas de superfícies do potencial eletrostático (MPE) e de E_{LUMO} para dendrímeros com uma ramificação contendo 3-hidroxiavona, quercetina e NFOH podem ser observados na Figura 19.

FIGURA 19 – Confôrmeros de menor energia de dendrímicos com uma ramificação contendo (1) 3-hidroxi-flavona, (2) quercetina e (3) NFOH resultantes das simulações de dinâmica molecular. Estão representados as ligações de hidrogênio (linhas verdes), modelos CPK, MPEs e de E_{LUMO} . As variações de coloração dos MPE foram de $-8,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $8,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso) e das superfícies de E_{LUMO} de $-4,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $4,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso). Carbono em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco.

O dendrímero com uma ramificação contendo 3-hidroxiavona apresentou duas ligações de hidrogênio, como observado na Tabela XIII, ambas envolvendo o inositol e ácido L-málico (2,29 Å e 3,00 Å, respectivamente) (Figura 19). Estas interações intramoleculares, provavelmente, prejudicariam a aproximação de uma esterase inespecífica nesta região da molécula. Assim, sob o ponto de vista conformacional, a atuação enzimática provavelmente ocorreria no carbono carbonílico próximo ao agente ativo, por este apresentar menor impedimento estérico. A distribuição da E_{LUMO} ocorreu somente no carbono carbonílico próximo à 3-hidroxiavona. Portanto, este resultado sugere que esta região é a mais favorável para sofrer um ataque nucleofílico enzimático. Em adição, análises do MPE revelaram que o carbono carbonílico próximo ao inositol apresentou densidade eletrônica ligeiramente menor e, portanto, insignificante, quando comparada à carbonila próxima ao agente ativo. Assim, todos os resultados obtidos para o dendrímero contendo uma ramificação com 3-hidroxiavona sugerem que a quebra da ligação éster provavelmente ocorrerá próxima ao agente ativo.

O confórmero de menor energia resultante das simulações de dinâmica molecular do dendrímero com uma ramificação contendo quercetina apresentou apenas uma ligação de hidrogênio entre o inositol e ácido L-málico (2,82 Å) (Figura 19). Possivelmente, esta interação intramolecular dificultaria a aproximação enzimática nesta porção da molécula. Em adição, análises da distribuição da E_{LUMO} mostraram o carbono carbonílico próximo à quercetina com maior deficiência de elétrons, portanto, região mais favorável para o ataque nucleofílico de uma enzima. O MPE apresentou densidade eletrônica ligeiramente menor, observada pelas colorações verde/azul (neutra/positiva), na carbonila próxima ao inositol. Entretanto, considerando-se principalmente a distribuição da E_{LUMO} e os parâmetros estéricos (modelo CPK, *Corey-Pauling-Koltun*), a provável quebra do dendrímero parece ser no carbono carbonílico próximo ao agente ativo.

Diferentemente dos resultados anteriores, não foram observadas ligações de hidrogênio no dendrímero com uma ramificação contendo NFOH (Figura 19). O modelo CPK apresentou a carbonila próxima ao inositol como mais favorável à aproximação

enzimática. Além disso, o MPE mostrou uma região com menor densidade eletrônica (coloração verde/azul-positiva/neutra) próxima ao inositol. Ambas as carbonilas não apresentaram distribuição de E_{LUMO} próximo delas. Portanto, com estes resultados, o ponto mais favorável para a quebra da ligação éster parece ser próximo ao inositol, principalmente pela disponibilidade espacial do carbono carbonílico desta região.

O confômero de menor energia resultante das simulações de dinâmica molecular do dendrímero planejado com duas ramificações contendo quercetina apresentou 4 ligações de hidrogênio intramolecular: (1) duas envolvendo o inositol e ácido L-málico (2,26 Å e 2,37 Å) e (2) duas entre o ácido L-málico e a quercetina (2,59 Å e 3,13 Å) (Figura 20). Estas interações entre as ramificações podem dificultar a aproximação enzimática na região próxima ao centro do dendrímero. O modelo CPK confirma esta hipótese. Nele, pode-se observar que a carbonila próxima ao agente ativo está mais disponível espacialmente, portanto mais favorável para a hidrólise da ligação éster. Em adição, o mesmo grupo funcional mostrou menor densidade eletrônica no MPE, com coloração entre verde/azul-neutra/positiva. No mapa de distribuição de E_{LUMO} , o mesmo comportamento foi observado. A carbonila próxima à quercetina mostrou-se mais favorável ao ataque nucleofílico enzimático pela menor densidade eletrônica verificada em sua região. Assim, estes resultados levam à hipótese de que, provavelmente, a quebra do dendrímero com duas ramificações com quercetina será próxima ao agente ativo.

O dendrímero com duas ramificações contendo NFOH apresentou cinco ligações de hidrogênio: (1) 2,58 Å e 2,98 Å entre o espaçante e o NFOH e (2) 2,68 Å, 2,71 Å e 3,14 Å entre o inositol e ácido L-málico, como verificado na Figura 20. Estas interações, provavelmente, contribuíram para a conformação espacial adquirida pela molécula. O modelo CPK mostrou a carbonila próxima ao inositol como mais promissora para a aproximação enzimática. Em adição, observa-se no MPE que esta região próxima ao foco central do dendrímero apresentou coloração verde/azul-neutra/positiva, indicando ser a área mais propícia para a ação de uma esterase inespecífica. Nas carbonilas de interesse deste estudo não se observou distribuição da E_{LUMO} . Entretanto, principalmente pelos resultados da disposição espacial das carbonilas, bem como os

relativos às análises das colorações do MPE, o ponto mais favorável para a hidrólise da ligação éster para este dendrímero parece ser na carbonila próxima ao inositol.

FIGURA 20 – Confôrmeros de menor energia de dendrímeros com duas ramificações contendo (1) quercetina e (2) NFOH resultantes das simulações de dinâmica molecular. Estão representados as ligações de hidrogênio (linhas verdes), modelos CPK, MPEs e de E_{LUMO} . As variações de coloração dos MPE foram de $-8,5 e^{-2}$ (vermelho intenso) a $8,5 e^{-2}$ (azul intenso) e das superfícies de E_{LUMO} de $-4,5 e^{-2}$ (vermelho intenso) a $4,5 e^{-2}$ (azul intenso). Carbono em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco.

Os modelos CPK, bem como os MPE e distribuições de E_{LUMO} dos dendrímeros com três ramificações com quercetina e NFOH dos confôrmeros de menor energia provenientes das simulações de dinâmica molecular estão representados na Figura 21. O dendrímero com quercetina mostrou cinco ligações de hidrogênio (2,67 Å, 2,73 Å, 2,80 Å, 3,03 Å e 3,08 Å), que, provavelmente contribuíram para o arranjo espacial da molécula. O menor impedimento estérico entre as carbonilas de interesse foi observado na região próxima ao agente ativo, como verificado no modelo CPK. As propriedades do MPE indicaram a mesma carbonila como mais promissora ao ataque nucleofílico enzimático, por esta região apresentar densidade eletrônica ligeiramente menor (coloração verde/azul-netra/positiva), quando comparada aos outros carbonos carbonílicos do estudo. Em adição, o mapa de distribuição da E_{LUMO} confirma esta hipótese, com região de menor densidade eletrônica próxima à quercetina. Portanto, a carbonila mais suscetível para a ação enzimática parece ser a próxima ao agente ativo, principalmente pelo menor impedimento estérico observado nesta região.

O dendrímero contendo NFOH apresentou onze ligações de hidrogênio (2,15, 2,67, 2,73, 2,73, 2,75, 2,76, 2,82, 2,82, 3,10, 3,18 e 3,18 Å) (Figura 21). Estas interações entre as ramificações, provavelmente, contribuíram para a estabilidade e conformação adotada pela molécula. O modelo CPK indicou a carbonila próxima ao NFOH como mais promissora à aproximação enzimática. Por outro lado, uma região neutra/positiva (verde/azul) foi verificada próxima ao centro do dendrímero no MPE, portanto, área com menor densidade eletrônica e mais favorável ao ataque nucleofílico de uma esterase inespecífica. Assim como nos dendrímeros de NFOH discutidos anteriormente, não houve distribuição de E_{LUMO} nas carbonilas de interesse. Como pode ser observada na Figura 21, esta distribuição aconteceu apenas no agente ativo. Assim, como houve contradição nos resultados de disposição espacial e distribuição eletrônica nas carbonilas, a quebra deste dendrímero parecer ser no carbono carbonílico próximo ao NFOH por este apresentar melhor disponibilidade espacial para a ação enzimática.

FIGURA 21 – Confôrmeros de menor energia de dendrímeros com três ramificações contendo (1) quercetina e (2) NFOH resultantes das simulações de dinâmica molecular. Estão representados as ligações de hidrogênio (linhas verdes), modelos CPK, MPEs e de E_{LUMO} . As variações de coloração dos MPE foram de $-8,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $8,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso) e das superfícies de E_{LUMO} de $-4,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $4,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso). Carbono em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco.

Os dendrímeros planejados com quatro ramificações (modelo A) com quercetina e NFOH podem ser observados na Figura 22. O composto com quercetina apresentou cinco ligações de hidrogênio intramoleculares (1,74, 2,16, 2,65, 2,85 e 2,86 Å). Além disso, no modelo CPK, menor impedimento estérico foi verificado na carbonila próxima ao foco central. Assim, esta região parece ser mais favorável a um ataque enzimático. O mesmo grupo mostrou menor densidade eletrônica, coloração verde, visualizado no MEP. A deficiência em elétrons nesta área favorece a ação enzimática. A distribuição de E_{LUMO} foi observada na carbonila perto da quercetina. Portanto, considerando principalmente o impedimento estérico e densidade eletrônica, provavelmente a liberação do inositol ocorrerá próxima do agente ativo.

O pró-fármaco dendrimérico contendo NFOH apresentou onze ligações de hidrogênio intramoleculares (1,82, 1,97, 2,20, 2,40, 2,44, 2,81, 2,89, 2,95, 2,99, 3,09, 3,19 Å), que parecem contribuir com o arranjo conformacional adotado por este sistema (Figura 22). O modelo CPK mostrou a carbonila próxima ao inositol como o mais promissora para aproximação enzimática. Esta informação corroborou a análise de MEP. O mesmo grupo apresentou região com densidade eletrônica neutra/positiva (coloração verde/azul), favorável ao ataque nucleofílico. A distribuição de E_{LUMO} não ocorreu na carbonila de interesse.

FIGURA 22– Conformêros de menor energia de dendrímeros com quatro ramificações (modelo A) contendo (1) quercetina e (2) NFOH resultantes das simulações de dinâmica molecular. Estão representados as ligações de hidrogênio (linhas verdes), modelos CPK, MPEs e de ELUMO. As variações de coloração dos MPE foram de $-8,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $8,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso) e das superfícies de E_{LUMO} de $-4,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $4,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso). Carbono em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco.

Na Figura 23 estão representados os pro-fármacos dendriméricos planejados com quatro ramificações (modelo B), contendo quercetina e NFOH. Provavelmente, no composto com quercetina, o início da desmontagem do dendrímero ocorrerá na carbonila próxima ao foco central. As análises dos modelos tubo e CPK, assim como o MEP, explicam essa hipótese. Em relação ao CPK, o carbono carbonílico perto do inositol apresentou menor impedimento estérico. Adicionalmente, no modelo de tubo, observaram-se oito ligações de hidrogênio intramoleculares (2,09, 2,19, 2,20, 2,47, 2,64, 2,87, 2,95, 3,00 Å), que são relevantes para a estabilidade e arranjo conformacional do sistema. A coloração verde no MEP (neutra), sobre o mesmo carbono, indica que a região é passível de sofrer um ataque nucleofílico enzimático. Por outro lado, a distribuição de E_{LUMO} foi verificada em outro grupo carbonila. Portanto, possivelmente a hidrólise do éster ocorrerá na carbonila perto do inositol.

Considerando as análises dos modelos tubo, CPK e distribuição de densidade eletrônica do composto correspondente com NFOH, a carbonila próxima ao agente ativo parece ser a mais promissora para sofrer a ação enzimática (Figura 23). Onze ligações de hidrogênio intramoleculares foram observadas no modelo tubo (1,82, 2,10, 2,11, 2,14, 2,60, 2,66, 3,00, 3,05, 3,02, 3,08, 3,17 Å). Em CPK, um pequeno impedimento espacial pôde ser visualizado na região próxima ao NFOH. Além disso, a coloração verde/azul (neutra/positiva) no MPE sobre a mesma carbonila sugere que a hidrólise enzimática acontecerá neste carbono. Já a distribuição de E_{LUMO} não ocorreu nas carbonilas do ácido L-málico.

FIGURA 23– Conformêros de menor energia de dendrímeros com quatro ramificações (modelo B) contendo (1) quercetina e (2) NFOH resultantes das simulações de dinâmica molecular. Estão representados as ligações de hidrogênio (linhas verdes), modelos CPK, MPEs e de ELUMO. As variações de coloração dos MPE foram de $-8,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $8,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso) e das superfícies de E_{LUMO} de $-4,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $4,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso). Carbono em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco. Os possíveis pontos de quebra de ligações estão indicados com setas brancas e pretas.

Os dendrímeros com cinco ramificações contendo quercetina e NFOH estão representados na Figura 24. No composto com quercetina, a carbonila próxima ao agente ativo parece estar mais favorável para a ação enzimática. Sete ligações de hidrogênio foram visualizadas no modelo tubo (1,98, 2,27, 2,41, 2,63, 2,98, 2,99, 3,0 Å). Como discutido anteriormente, estas interações intramoleculares contribuem para o arranjo conformacional adotado pelo sistema. Em CPK, menor impedimento estérico foi observado no carbono próximo à quercetina. O mesmo grupo apresentou região neutra no MPE (coloração verde), portanto, passível de sofrer ataque nucleofílico. A distribuição de E_{LUMO} ocorreu em outra carbonila.

No modelo contendo NFOH, treze ligações de hidrogênio intramoleculares foram observadas (1.99, 2.31, 2.67, 2.75, 2.77, 2,87, 2,90, 2,97, 3,03, 3,08, 3,15, 3,19, 3,20 Å). Além disso, no MPE, verificou-se região neutra (coloração verde), no carbono próximo ao foco central. A distribuição de E_{LUMO} não contribuiu para estes resultados, uma vez que não ocorreu no grupo carbonila de interesse. Portanto, as análises dos resultados indicam a carbonila próxima ao inositol como mais promissora em sofrer a hidrólise enzimática.

FIGURA 24 – Confôrmeros de menor energia de dendrímeros com cinco ramificações contendo (1) quercetina e (2) NFOH resultantes das simulações de dinâmica molecular. Estão representados as ligações de hidrogênio (linhas verdes), modelos CPK, MPEs e de E_{LUMO} . As variações de colorações dos MPE foram de $-8,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $8,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso) e das superfícies de E_{LUMO} de $-4,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $4,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso). Carbono em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco.

No modelo com seis ramificações e quercetina, o grupo carbonila próximo ao inositol parece ser o mais promissor para sofrer aproximação enzimática e, conseqüentemente, o ataque nucleofílico. Assim, para este pró-fármaco dendrimérico a desmontagem provavelmente começará no foco central, liberando, em seguida, os agentes ativos. Os modelos tubo e CPK, bem como o MPE, visualizados na Figura 25, confirmam esta hipótese. Observaram-se menor impedimento estérico no carbono carbonílico próximo ao inositol e treze ligações de hidrogênio intramoleculares (2.12, 2.20, 2.31, 2.56, 2.65, 2.68, 2.72, 2.93, 3.05, 3.09, 3.12, 3.14, 3.16 Å). Em adição, no MPE e sobre o mesmo carbono, verificou-se região de coloração verde, portanto, neutra e passível de sofrer ação enzimática. A distribuição de E_{LUMO} aconteceu em outro grupo carbonila, perto da quercetina.

Treze ligações de hidrogênio intramoleculares foram observadas no dendrímero correspondente de NFOH (1.89, 2.01, 2.79, 2.79, 2.83, 2.85, 2.86, 2.88, 2.87, 3.05, 3.06, 3.12, 3.15 Å) (Figura 25). A análise dos modelos tubo e CPK sugerem que o carbono próximo ao agente ativo sofrerá a ação enzimática. As propriedades do MEP corroboram esta afirmação pois existe uma região de coloração verde/azul (neutra/positiva) sobre este carbono. A distribuição de E_{LUMO} não ocorreu nas carbonilas investigadas neste estudo.

FIGURA 25 – Confôrmeros de menor energia de dendrímeros com seis ramificações contendo (1) quercetina e (2) NFOH resultantes das simulações de dinâmica molecular. Estão representados as ligações de hidrogênio (linhas verdes), modelos CPK, MPEs e de ELUMO. As variações de coloração dos MPE foram de $-8,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $8,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso) e das superfícies de E_{LUMO} de $-4,5 \text{ e}^{-2}$ (vermelho intenso) a $4,5 \text{ e}^{-2}$ (azul intenso) e^{-2} . Carbono em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco.

Estes estudos de modelagem molecular foram de suma importância para uma avaliação preliminar do comportamento de hidrólise destes pró-fármacos dendriméricos

potencialmente antichagásicos e leishmanicidas em ambiente biológico. Metodologias de síntese para estes compostos estão sendo realizadas, como serão descritas a seguir, e pretende-se, posteriormente, realizar os experimentos práticos para se validar estes resultados computacionais, utilizando-se modelos de enzima.

4.1.2 Estudos de dinâmica molecular dos pró-fármacos dendriméricos de segunda geração

Como não existem dados cristalográficos dos pró-fármacos dendriméricos descritos neste projeto de doutorado, o objetivo deste estudo de modelagem molecular foi obter informações mais precisas sobre a conformação dos dendrímeros de segunda geração com duas, quatro, seis (modelos A e B), oito (modelos A e B), dez e doze ramificações. As representações esquemáticas 2D destas estruturas podem ser visualizadas na Figura 26.

Empregaram-se simulações curtas de DM com temperaturas progressivamente mais elevadas até que a temperatura corporal fosse atingida. Para cada simulação de temperatura, a conformação de energia mínima foi selecionada e utilizada como geometria de partida para a próxima temperatura. Parâmetros de estabilidade estrutural, tais como E_{total} e número de ligações de hidrogênio, foram analisados.

FIGURA 26 – Representação esquemática dos dendrímeros de segunda geração com duas, quatro, seis (modelos A e B), oito (modelos A e B), dez e doze ramificações. Composto ativo: 3-hidroxiflavona, quercetina e NFOH.

A Tabela XIV apresenta os parâmetros de estabilidade estrutural dos confôrmers de menor energia resultantes das simulações de DM a 310 K construídos com duas, quatro, seis (modelos A e B), oito (modelos A e B), dez e doze ramificações contendo 3-hidroxi-flavona, quercetina e NFOH. Podem-se observar nesta Tabela que os compostos contendo 3-hidroxi-flavona foram os mais energeticamente desfavoráveis, por exemplo, as moléculas com quatro, seis (modelos A e B), oito (modelos A e B), dez e doze ramificações apresentaram valores positivos de E_{total} (11,0, 193,36, 177,34, 280,68, 303,75, 363,97 e 471,97 kcal/mol, respectivamente). Em adição, comparados com os dendrímeros correspondentes com duas ramificações, o modelo com 3-hidroxi-flavona apresentou o maior valor de E_{total} (NFOH = -139,48 kcal/mol; quercetina = -131,04 kcal/mol 3-hidroxi-flavona = -13,56 kcal/mol). De um modo geral, interações intramoleculares parecem ter sido importantes para a estabilidade adquirida pelos sistemas. Por exemplo, os menores valores de E_{total} foram acompanhados por maior número de ligações de hidrogênio na série com duas ramificações (NFOH = cinco interações, com: 1,92, 2,88, 2,90, 3,14 e 3,14 Å; quercetina = duas interações, com: 2,62 e 2,99 Å; 3-hidroxi-flavona = nenhuma ligação de hidrogênio).

Com exceção da molécula com duas ramificações, os dendrímeros com quercetina foram os que apresentaram maior estabilidade estrutural. O menor valor E_{total} e o maior número de ligações de hidrogênio de toda série foi observado no sistema com doze ramificações (E_{total} = -1074,48 kcal/mol; vinte e três ligações de hidrogênio, com: 2,25, 2,29, 2,37, 2,47, 2,48, 2,60, 2,64, 2,72, 2,76, 2,85, 2,87, 2,88, 2,91, 2,91, 2,95, 2,96, 2,96, 2,97, 3,00, 3,03, 3,11, 3,15, 3,15 Å).

Já a série com NFOH apresentou valores intermediários E_{total} , quando comparada aos compostos correspondentes com 3-hidroxi-flavona e quercetina, com exceção da molécula com duas ramificações. O dendrímero com NFOH e dez ramificações apresentou o menor valor de E_{total} (-454,00 kcal/mol) e o maior número de interações intramoleculares desta série (vinte e duas ligações de hidrogênio: 2,02, 2,11, 2,16, 2,18, 2,23, 2,37, 2,47, 2,67, 2,78, 2,78, 2,86, 2,93, 2,95, 2,97, 2,97, 3,00, 3,01, 3,03, 3,06, 3,08, 3,11, 3,12 Å).

Tabela XIV – Parâmetros dos dedrimeros de segunda geração com 3-hidroxi flavona, quercetina e NFOH

Dendrímtero de segunda geração	Ramificações							
	Duas	Quatro	Seis (modelo A)	Seis (modelo B)	Oito (modelo A)	Oito (modelo B)	Dez	Doze
	E_{total} (kcal/mol)							
3-hidroxi flavona	-13,56	11,01	193,36	177,34	280,68	303,75	363,97	471,97
quercetina	-131,04	-302,55	-504,60	-622,15	-855,99	-766,36	-986,67	-1074,48
NFOH	-139,48	-191,44	-284,37	-302,34	-308,44	-329,46	-454,00	-316,32
	Número de ligações de hidrogênio							
3-hidroxi flavona	0	8	7	5	6	10	4	14
quercetina	2	3	8	14	12	17	23	23
NFOH	5	4	3	7	11	14	22	10

Os dendrímeros de segunda geração construídos com duas, quatro, seis (modelos A e B), oito (modelos A e B), dez e doze ramificações contendo 3-hidroxiavona, quercetina e NFOH podem ser vistos na Figura 27. Estes modelos foram selecionados das simulações de DM em 310 K.

FIGURA 27– Confôrmeros de menor energia de dendrímeros de segunda geração com duas, quatro, seis (modelos A e B), oito (modelos A e B), dez e doze ramificações contendo 3-hidroxi flavona, quercetina e NFOH resultantes das simulações de dinâmica molecular a 310 K. Carbono em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e hidrogênio em branco.

4.2 SÍNTESE

Os espectros dos compostos obtidos por síntese encontram-se no Anexo 1 e são discutidos nesse item, junto às considerações sobre os processos sintéticos utilizados.

4.2.1 Síntese do derivado hidroximetilnitrofural (NFOH)

O NFOH é molécula de suma importância para este projeto. Assim, sua síntese foi repetida durante este período com a finalidade de: (1) obter o dendrímero de primeira geração deste composto pelo método divergente e (2) realizar seus estudos de fotoestabilidade.

As reações foram realizadas ao abrigo da luz devido à fotossensibilidade do nitrofural. O rendimento da reação foi de 70%. Obteve-se sólido amarelo e o produto foi caracterizado no IV e RMN. O espectro 1, no IV, mostrou bandas características deste produto: em 1674 cm^{-1} , relacionada com estiramento de grupo carbonila de amidas, 1526 e 1361 cm^{-1} com as deformações axial assimétrica e simétrica, respectivamente de grupo nitro.

O espectro 2, de RMN de ^1H , mostra sinais característicos do NFOH, por exemplo, um tripleto em 4,61 ppm, relacionado ao grupo metileno deste produto, e um em 5,49 ppm, com o grupo OH deste derivado.

O espectro 3, de RMN ^{13}C do NFOH, mostra, além dos sinais característicos do NF, sinal em 62,97 ppm, relativo ao carbono do grupo CH_2 deste derivado hidroximetilado.

Tais análises caracterizam a obtenção do produto, o NFOH.

4.2.2 Síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila) acético (ácido málico protegido)

Assim como o NFOH, o ácido málico protegido foi sintetizado diversas vezes durante a execução do projeto. Este composto é fundamental para a síntese de todos os intermediários dos dendrímeros, de primeira e segunda geração.

Os resultados de IV e RMN do produto final obtido (cristais aciculares brancos) foram semelhantes aos descritos por Green e colaboradores (2000). No IV (espectro 4), podem-se observar as bandas principais em 1765 cm^{-1} e 1735 cm^{-1} , relacionadas com as funções lactona e ácido carboxílico, respectivamente. O espectro de RMN ^1H (espectro 5) mostra um sinal que comprova a obtenção do produto em 1,53 ppm relativo às metilas do ácido málico protegido, as quais não estão presentes no material de partida, o ácido L(-)-málico. Já o espectro 6 (de ^{13}C), mostra os sinais das metilas e do C quaternário, em 25,14 ppm, 25,87 ppm e 35,04 ppm, respectivamente, que caracterizam o produto desejado.

O rendimento da reação para o produto impuro foi de 75%. Após a purificação, este valor caiu para 50%.

4.2.3 Síntese dos dendrímeros de primeira geração

4.2.3.1 Método convergente

O método convergente inicia com a síntese das ramificações que, posteriormente, irão se ligar com o foco central para originar o dendrímero. Esta abordagem sintética foi planejada para a 3-hidroxiavona porque os flavonóides ativos escolhidos, diferentemente do NFOH, apresentam estabilidade térmica e à luz, além de serem mais estáveis nas condições reacionais. Neste contexto, os intermediários construídos com a 3-hidroxiavona ou quercetina e o ácido málico representam as ramificações necessárias para reagir com o inositol e originar a primeira geração dos dendrímeros pelo método convergente. Uma vez dominada esta síntese, procedimento equivalente será aplicado para a obtenção do dendrímero de primeira geração com NFOH.

Vale ressaltar que, devido à dificuldade de purificação destes produtos, optou-se por realizar as sínteses dos intermediários e dendrímero de primeira geração para, depois, realizar tentativas de purificação dos compostos obtidos.

4.2.3.1.1 *Síntese do intermediário I (3-hidroxiavona e ácido málico protegido)*

O intermediário I é formado pela esterificação entre o álcool e o ácido carboxílico da 3-hidroxiavona e ácido málico protegido, respectivamente. Este composto foi planejado com o intuito de se sintetizar a primeira geração do dendrímero pelo método convergente.

Os objetivos de cada método desenvolvido (1A a 1C, 2A e 2B, 3A a 3E) e os respectivos rendimentos dos procedimentos sintéticos estão descritos na Tabela XV. Em todas as metodologias, obteve-se um sólido amarelo.

Tabela XV – Objetivos dos métodos de síntese do intermediário I

<div style="text-align: center;"> <p>Intermediário I Sólido amarelo</p> </div>		
Método	Objetivos	Rendimento bruto (%)
1A	Obter o intermediário I com o agente condensante DCC	90
1B	Aperfeiçoar o método 1A	70
1C	Aperfeiçoar o método 1A, uma vez que o método 1B não foi realizado com sucesso	79
2A	Obter o intermediário I com método que não utilizasse o agente condensante DCC para evitar a formação do DCU	10
2B	Aperfeiçoar a metodologia 2A	80
3A	Obter o intermediário I utilizando o agente condensante EDC	-*
3B	Aperfeiçoar o método 3A. Problemas na etapa seguinte, a de desproteção do ácido málico, levaram ao método 3C	-*
3C	Acumular produto e utilizar o intermediário I em testes da etapa seguinte, a desproteção do ácido málico	-*
3D	Acumular produto e aperfeiçoar a metodologia de desproteção do ácido málico desenvolvida com o produto resultante de 3C	-*
3E	Acumular produto e aperfeiçoar a metodologia de desproteção do ácido málico, uma vez que não se obteve sucesso na metodologia 3D	-*

* Rendimento maior que 100% devido à presença de impurezas na amostra

O método 1A partiu de pequenas proporções de reagentes porque o principal intuito desta metodologia era testar as condições sintéticas desenvolvidas por Dusting e

colaboradores (2006) com os materiais de partida utilizados na síntese do intermediário I.

Os dados cromatográficos mostraram a formação de duas manchas na CCD. A primeira delas apresentou R_f de 0,62, portanto, diferente do observado para a segunda mancha referente à 3-hidroxiflavona, com valor de R_f de 0,83. Além disso, a formação do éster entre o flavonóide e o ácido málico protegido ficou evidente com a banda em 1726 cm^{-1} resultante das análises no IV (espectro 7). Neste mesmo espectro observa-se a banda em 1607 cm^{-1} , que pode estar relacionada com a amida presente no DCU (*N,N'*-dicicloexiluréia), produto secundário formado na utilização de DCC. O mecanismo de formação do DCU pode ser observado na Figura 28.

FIGURA 28 – Mecanismo de formação do produto secundário DCU com utilização do agente condensante DCC (CHRISTIE, 1993).

Os resultados de RMN também mostraram dados interessantes, por exemplo, os singletos em 1,50 e 1,52 ppm, que podem estar relacionados com os hidrogênio H_4 e H_5 das metilas pertencentes ao ácido málico protegido (espectro 8). Em adição, observou-se excesso de sinais porque o composto estava impuro. Porém, os sinais na região entre 7 e 8 ppm podem ser relativos aos hidrogênios dos anéis do flavonóide. No espectro de ^{13}C (espectro 9) os sinais em 24 e 25 ppm referentes aos C_6 e C_7 foram os principais indicativos da presença do ácido málico protegido neste intermediário. Também foi possível observar neste espectro os sinais na região de 130 ppm, indicativos da presença dos carbonos dos anéis da 3-hidroxiflavona.

A CCD mostrou, após 48 horas de reação para o método 1, duas manchas com valores de R_f de 0,18 e 0,77. Assim, estes valores foram diferentes dos encontrados para os materiais de partida, 3-hidroxiflavona ($R_f = 0,75$) e ácido málico protegido

($R_f = 0,57$). Porém, observaram-se no espectro de RMN ^1H (espectro 10), que os sinais da 3-hidroxiavona (7-8 ppm) foram muito mais evidentes que os do espaçante (nas regiões de 1,50 e 1,52 ppm - H_4 ou H_5 - e em 2,74 e 4,50 - H_2 e H_3). Assim, existem duas hipóteses para este resultado: (1) o rendimento da reação foi muito baixo ou (2) a reação não aconteceu.

A formação de duas manchas na CCD com valores de R_f de 0,08 e 0,83, portanto, diferentes daquelas observadas para os materiais de partida, foi o primeiro indício da obtenção do intermediário I pelo método 1C. Além disso, no espectro de ^1H (espectro 11), observam-se sinais na região de 1,59 e 1,62 ppm, provavelmente relacionados com os H_4 e H_5 do ácido málico protegido, assim como os observados próximos a 2,8 e 4,8 ppm, relativos a H_2 ou H_3 . Em adição, existem sinais evidentes na região entre 7-8 ppm, que podem ser referentes aos hidrogênios da 3-hidroxiavona. O conjunto de dados resultantes das análises de CCD e RMN fizeram com que a etapa seguinte, para este produto, fosse realizada.

Em todos eles é possível se observar os excessos de sinais resultantes das impurezas dos procedimentos reacionais.

Os produtos resultantes dos métodos 1A, 1B e 1C foram utilizados, após a etapa de desproteção do ácido málico protegido, na síntese do dendrímero de primeira geração com 3-hidroxiavona. Em adição, com dendrímero resultante do método 4A, realizaram-se tentativas de purificação para a retirada, em especial, do produto secundário DCU. Não se obteve sucesso nas tentativas empregadas. Dessa maneira, o principal objetivo dos métodos 2A e 2B foi desenvolver uma rota sintética que não utilizasse o agente condensante DCC, facilitando, portanto, a etapa posterior de purificação. Assim, 2A e 2B utilizaram como reagentes para a esterificação entre o ácido málico protegido e a 3-hidroxiavona a *N*-metil morfina e o cloroformato de etila. O mecanismo desta reação pode ser observado na Figura 29.

FIGURA 29 – Mecanismo de reação com a utilização de *N*-metil morfolina e cloroformato de etila.

A CCD dos produtos das rotas empregadas mostraram mancha com valor de R_f de 0,67, portanto, diferente dos materiais de partida ácido málico protegido ($R_f = 0,57$) e 3-hidroxiflavona ($R_f = 0,75$).

Os espectros de RMN de 1H 12 e 13 são correspondentes aos produtos dos métodos 2A e 2B (composto puro), respectivamente. Em ambos, podem-se observar sinais que evidenciam a formação do intermediário I, por exemplo, os dubletos em 1,46 e 1,53 ppm; 1,59 e 1,62 ppm (métodos 2A e 2B, respectivamente). Os multipletos em 3,21 ppm (método 2A) e 3,27 ppm (método 2B) podem ser de H_2 do ácido málico protegido. Em 4,96 ppm (método 2A) e 4,84 ppm (método 2B) verificam-se sinais que podem ser relativos ao H_3 do ácido málico protegido. Os sinais próximos de 7 ppm, em ambos os espectros, podem ser da 3-hidroxiflavona. Em adição, pode-se constatar a melhor qualidade dos resultados, quando comparados com os das metodologias com DCC.

Vale ressaltar que o rendimento da reação 2A foi muito baixo e o produto obtido não foi utilizado na etapa seguinte, a desproteção do ácido málico.

Concomitantemente à reação utilizando *N*-metil morfolina e cloroformato de etila, realizaram-se as tentativas de síntese do intermediário I utilizando-se os reagentes EDC e DMAP. O objetivo principal desta rota sintética foi o mesmo que para os métodos 2A e 2B, ou seja, facilitar o processo de purificação pela ausência do produto secundário DCU. O EDC forma produto secundário solúvel em água e de fácil remoção. O mecanismo da reação com EDC pode ser visualizado na Figura 30.

FIGURA 30 – Mecanismo de reação com a utilização do agente condensante EDC.

Todos os produtos apresentaram duas manchas na CCD. Os valores dos R_f foram de 0,25 e 0,88 para as manchas 1 e 2, respectivamente.

Com exceção do produto obtido pelo método 3D, os demais 3A, 3B, 3C e 3E apresentaram indícios de se tratar do intermediário I. Os espectros de RMN de ^1H de números 14, 15, 16 e 18 mostram um dublete na região próximo a 1,5 ppm, os quais podem estar relacionados com os H_4 e H_5 do ácido málico protegido. Os sinais entre 3 e 3,5 ppm, bem como os próximos de 4,8 ppm (H_3), podem ser do H_2 do derivado protegido. A presença da 3-hidroxiflavona, em todos os espectros, é sugerida pelos sinais entre 7 e 8 ppm. Assim como nas metodologias com *N*-metil morfolina e clorofornato de etila, observaram-se sinais mais nítidos nos espectros, quando comparados com as reações que utilizaram DCC.

Não se obteve sucesso no método 3D. O ácido málico protegido é estável, à temperatura ambiente, por apenas um ou dois dias. Assim, problema com a estabilidade deste composto pode ter ocasionado este resultado (espectro de RMN de ^1H de número 17).

4.2.3.1.2 Síntese do intermediário II (desproteção do ácido málico)

Como há indícios da obtenção do intermediário I pelos métodos 1A, 1B, 1C, 2B, 3A, 3B, 3C e 3E, partiu-se para a etapa seguinte, a síntese do intermediário II. Este composto é formado pela desproteção dos grupos álcool e ácido carboxílico do ácido L-málico. O objetivo desta síntese é reagir, na fase posterior, este produto com o inositol para originar o dendrímero de primeira geração.

Para o produto resultante do método 1A, a formação de uma banda em 1731 cm^{-1} no IV (espectro 19) é um dos principais indicativos da obtenção do intermediário II após 24 horas de reação para a desproteção do ácido L-málico, pois o estiramento carbonila de ésteres aparece nesta região. Como verificado para o intermediário I, manteve-se a banda em 1628 cm^{-1} , que pode estar relacionada com o estiramento carbonila da amida presente no produto secundário DCU. Porém, a análise de RMN ^1H mostra sinais muito evidentes da 3-hidroxiflavona em relação ao espaçante, indicando a possível hidrólise do éster durante o desenvolvimento do método.

O intermediário II não foi obtido com o produto resultante do método 1B, como observado no espectro de ^1H (espectro 21). Neste, observam-se sinais apenas da 3-hidroxiflavona.

O intermediário II, provavelmente obtido com o produto proveniente do método 1C, foi analisado por RMN ^1H . Pode-se observar no espectro de ^1H (espectro 22) a ausência dos sinais H_4 e H_5 das metilas, em 1,59 e 1,62 ppm relativas ao ácido málico protegido. O sinal próximo a 4 ppm pode estar relacionado com a OH do espaçante. Existem sinais na região entre 7-8 ppm que podem estar relacionados com o flavonóide. Além disso, a CCD mostrou apenas uma mancha, de R_f 0,91, evidenciando a formação de um produto mais polar que o intermediário I obtido pelo mesmo método.

Em todos os espectros, o sinal bem evidente que aparece próximo de 2 ppm pode ser da metila do do ácido acético, reagente necessário na etapa de desproteção do ácido málico protegido. Em adição, o excesso de sinais na região 1-2 ppm, também identificados em todos os espectros, podem ser do DCU.

Aparentemente, houve a quebra da ligação éster do intermediário I proveniente do método 2B. No espectro de RMN de ^1H (espectro 23) não se observam sinais do espaçante.

Não se obteve sucesso na síntese dos intermediários II quando foi utilizado, como material de partida, o intermediário I, obtido no método 3A e 3B. Nos espectros de RMN de ^1H (espectro 24 e 25), podem-se observar apenas sinais relativos aos hidrogênios da 3-hidroxiflavona na região entre 7 e 8 ppm, correspondente aos anéis aromáticos. Provavelmente, a condição reacional aplicada (água/THF/ácido acético glacial, 1:1:1,

v/v/v) foi responsável pela hidrólise do intermediário I. Assim, novas rotas sintéticas foram desenvolvidas na tentativa de se obter o intermediário II.

O intermediário I, obtido pelo método 3C, foi utilizado como material de partida nas novas tentativas de desproteção do ácido málico. Estas rotas sintéticas utilizaram: (1) ácido clorídrico 1 M; (2) ácido clorídrico 1 M e acetonitrila (1:1, v/v) e (3) ácido clorídrico 1 M e THF (1:1, v/v). Os espectros são os de números 26, 27 e 28, respectivamente. Em todos eles, parece haver mistura de produtos de hidrólise e intermediário II. Porém, para o composto desejado, podem-se observar a manutenção dos sinais característicos do ácido L-málico, principalmente nas regiões entre 3 a 3,5 ppm (H_2) e 4 a 5 ppm (H_3). Em adição, houve o desaparecimento das metilas do ácido málico protegido próximo de 1,55 ppm. Os sinais que podem representar a 3-hidroxiflavona, entre 7-8 ppm, aparecem em todos os espectros.

Em todas as metodologias, as CCDs apresentaram duas manchas: uma relativa ao intermediário I e outra mais retida pela sílica, por representar produto mais polar.

Como o melhor resultado de desproteção do ácido málico protegido foi obtido com o uso de ácido clorídrico 1 M e acetonitrila (1:1, v/v), a etapa de abertura do anel do intermediário I, resultante do método 3E, foi realizada nestas condições sintéticas. O espectro de RMN de 1H (espectro 29) mostra que, possivelmente, o produto foi obtido. O desaparecimento dos sinais das metilas próximos de 1,62 ppm é o principal indício de que houve a desproteção do ácido málico. Em adição, houve a manutenção dos sinais em 3,26 ppm (H_2) e 4,82 ppm (H_3). Os hidrogênios dos núcleos da 3-hidroxiflavona apareceram na região entre 7-8 ppm. A CCD mostrou apenas uma mancha, que pode ser do intermediário II, com R_f de 0,5.

4.2.3.1.3 Síntese do dendrímero I (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e 3-hidroxiflavona)

Os resultados da síntese dos intermediários II, que utilizaram como materiais de partida os intermediários I provenientes dos métodos 1C, 3C e 3E, sugerem que estes produtos foram obtidos. Assim, nesta etapa, realizaram-se reações de esterificação entre os grupos álcoois do inositol e os ácidos destes intermediários, na tentativa de se

obter os dendrímeros de primeira geração de 3-hidroxiflavona. Os rendimentos e características dos produtos obtidos podem ser observados na Tabela XVI.

Tabela XVI: Rendimentos e características dos produtos obtidos nas tentativas de síntese do dendrímero de primeira geração de 3-hidroxiflavona

Dendrímtero I		
Método	Característica do produto	Rendimento bruto (%)
4A	Sólido amarelo escuro	90
5A	Sólido amarelo	37
5B	Sólido amarelo	21
6A	Sólido amarelo	65
7	Sólido amarelo	~*

* Rendimento maior que 100% devido à presença de impureza na amostra

O resultado da síntese da primeira geração do dendrímero de 3-hidroxiflavona, pelo método 4A, pode ser verificado no espectro 30 de RMN de ^1H . Os sinais entre 7 e 8 ppm podem ser do flavonóide. Já os da região entre 3,4 a 4 ppm são indícios da presença do inositol neste composto. Em adição, o multiplete verificado na região próxima a 2,49 ppm pode ser referente ao ácido L-málico (H_2). No IV, a banda fraca em 1738 cm^{-1} também pode ser indicativo da obtenção do produto (espectro 31). Apareceram três manchas em CCD, com R_f iguais a 0,17, 0,83 e 0,95. O material de partida, o intermediário II, apresentou R_f 0,96. Portanto, a CCD indica a possível formação do dendrímero, além de outros dois produtos que podem estar relacionados com o material de partida e impurezas do meio reacional.

A reação para obtenção do dendrímero com 3-hidroxiflavona por meio do método 5A não ocorreu. Este resultado pôde ser confirmado pelos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (32 e 33, respectivamente). Nestes, observam-se apenas sinais referentes aos hidrogênios do flavonóide.

Como não se obteve o dendrímero com 3-hidroxiflavona pelos métodos 4A e 5A, com o intermediário II resultante de 3E realizaram-se 3 tentativas de síntese do mesmo. A primeira delas utilizou como agente condensante o EDC (método 5B). A principal diferença para o método 5A foi o tempo de reação (5A = 24 horas e 5B = 72 horas). Dessa maneira, o objetivo foi avaliar se o tempo era o fator decisivo para que a reação ocorresse. Como observado nos espectros 34 e 35 (RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente), aparentemente não se obteve sucesso nesta rota sintética (5B) porque apareceram apenas sinais referentes ao flavonóide. Porém, a porção aquosa resultante do procedimento de extração foi analisada em RMN de ^1H (espectro 36). Ao contrário dos resultados anteriores, observaram-se sinais que poderiam caracterizar o produto desejado, por exemplo, entre 3-4 ppm, referentes ao inositol. Em adição, em 2,75 ppm existem sinais que podem ser dos hidrogênios do ácido málico e entre 7-8 ppm, do flavonóide. Estes resultados sugerem que, possivelmente, obteve-se o dendrímero, porém, com poucas ramificações. Assim, as hidroxilas livres do inositol fizeram com que o produto permanecesse na fase aquosa. Já a CCD mostrou 3 manchas de R_f de 0,83, 0,5 e 0,33. O intermediário II apresentou R_f de 0,5, portanto, 2 manchas são diferentes do material de partida.

O método de síntese do dendrímero contendo 3-hidroxiflavona partindo do intermediário II, resultante da etapa inicial 3E, utilizou como reagentes *N*-metil morfolina e cloroformato de etila (método 6A). Pode-se observar no espectro 37, de RMN ^1H , que existem sinais que podem ser do produto desejado, principalmente na região entre 3-4 ppm.

O método 7 de síntese do dendrímero contendo 3-hidroxiflavona, partindo do intermediário II resultante da etapa inicial 3E, utilizou como reagente o CDI. O mecanismo da reação com a utilização do agente condensante CDI pode ser visualizado na Figura 31.

FIGURA 31– Mecanismo de reação com a utilização do agente condensante CDI (CHRISTIE, 1993).

No espectro de RMN de ^1H (espectro 38) não apareceram sinais referentes ao inositol na região entre 3-4 ppm. Em adição, o espectro de ^{13}C apresentou apenas sinais dos carbonos do flavonóide (espectro 39). A fase aquosa, resultante do processo de extração, foi analisada em RMN ^1H (espectro 40). Existem sinais que podem ser do inositol (entre 3-4 ppm), ácido L-málico (H_2 em 2,76 ppm, H_3 em 4,70 ppm) e 3-hidroxiavona (entre 7-8 ppm). Portanto, estes resultados sugerem que: (1) a reação foi realizada com sucesso e (2) obteve-se um dendrímero com poucas ramificações.

4.2.3.1.4 Síntese do intermediário III (quercetina e ácido málico protegido)

O intermediário III foi planejado pela reação de esterificação entre o grupo ácido do ácido málico protegido e o grupo fenólico da quercetina. Este composto é essencial para este trabalho, pois, na etapa seguinte de desproteção do ácido málico protegido, haverá a formação da ramificação (quercetina + ácido málico) necessária para a síntese dos dendrímeros pelo método convergente.

Os objetivos de cada método desenvolvido (8A, 8B, 8C e 9) e os respectivos rendimentos dos procedimentos sintéticos estão descritos na Tabela XVII. Vale ressaltar que em todos os métodos foi obtido um sólido amarelo.

Tabela XVII – Objetivos dos métodos de síntese do intermediário III e rendimentos brutos dos produtos obtidos

<div style="text-align: center;"> <p>Intermediário III Sólido amarelo</p> </div>		
Método	Objetivos	Rendimento bruto (%)
8A	Obter o intermediário III utilizando o agente condensante DCC	90
8B	Aperfeiçoar a metodologia 8A	95
8C	Acumular produto para a etapa posterior, a purificação	98
9	Obter o intermediário III utilizando o agente condensante EDC	-*

* Rendimento maior que 100% devido à presença de impurezas na amostra

Após 22 horas de reação, a CCD do produto obtido pelo método 8A mostrou mancha que poderia representar o intermediário III por apresentar R_f de 0,72, diferente da quercetina, que mostrou valor de 0,83. Porém, os sinais observados no espectro 41, de RMN ^1H , não foram suficientes para caracterizar o produto.

O intermediário III possivelmente foi obtido pelo método 8B. O espectro de RMN de ^1H (espectro 42) apresenta sinais que podem estar relacionados com o produto desejado, por exemplo, em 1,74 e 1,76 ppm, referentes aos H_4 e H_5 do ácido málico protegido. Ainda em relação ao espaçante, o sinal próximo de 4,24 ppm pode caracterizá-lo. Os que apareceram entre 6-7 ppm, podem ser da quercetina.

A CCD do produto obtido pelo método 8C mostrou, após 24 horas de reação, 4 manchas. Os deslocamentos observados foram de R_f iguais a 0,08, 0,25, 0,83 e 0,92. Na mesma fase móvel, a quercetina apresentou $R_f=0,83$. A análise destes deslocamentos mostra que, provavelmente, existe quercetina que não reagiu, porém formaram-se produtos diferentes deste material de partida. Para o mesmo produto, no espectro de RMN de ^1H (espectro 43), verificam-se os sinais em 1,52 e 1,53 ppm, que podem ser dos H_4 e H_5 do ácido málico protegido. Em adição, os sinais próximos a

2,80 ppm também podem ser do ácido. Para a quercetina, a principal evidência de sua presença no produto são os sinais na região entre 6-7 ppm, correspondentes aos anéis aromáticos do flavonóide. Portanto, estes resultados sugerem que o produto foi formado, mas ainda se encontra impuro.

Entre 1-2 ppm existem sinais que podem ser relativos ao DCU, subproduto obtido durante a reação com DCC. Em adição, os espectros apresentaram muitos sinais devidos a impurezas.

O espectro de RMN de ^1H de número 44, mais definido da série, mostra que o intermediário III foi, provavelmente, obtido pelo método 9. Neste, podem-se observar sinais relativos aos hidrogênios H_4 e H_5 (1,53 e 1,54 ppm) do derivado ácido protegido, assim como o H_3 , em 4,99 ppm. Os sinais na região de 6 ppm podem ser dos hidrogênios da quercetina. Como verificado para os métodos anteriores, o excesso de sinais ocorreu porque o produto estava impuro. A CCD mostrou duas manchas principais com R_f de 0,67 e 0,83 (mesmo valor encontrado para a quercetina nas mesmas condições cromatográficas - clorofórmio/metanol 1:2, v/v). Assim, a análise deste deslocamento sugere que existe quercetina que não reagiu, porém formou-se produto diferente deste material de partida.

4.2.3.1.5 Síntese do intermediário IV (desproteção do ácido málico)

A desproteção dos grupos ácido e álcool do ácido málico protegido foi fundamental para a síntese do intermediário IV. Em etapa posterior, este composto ácido irá reagir com as hidroxilas do inositol para formação do dendrímero de primeira geração de quercetina.

Os dados de RMN de ^1H do produto resultante da desproteção do ácido málico, o intermediário III obtido na metodologia 8B, como material de partida, sugerem que a reação ocorreu. Apesar disso, a CCD foi inconclusiva, pois se formou mancha principal com R_f de 0,92, portanto muito próxima da quercetina ($R_f = 0,95$) na mesma condição cromatográfica (colocar fase móvel). No espectro de RMN de ^1H (espectro 45), o desaparecimento dos sinais em 1,51 e 1,53 ppm, relativos aos H_4 e H_5 do ácido málico protegido, e o surgimento dos sinais na região de 4,15 ppm, relacionados com a OH

primária do ácido L-málico, são indícios da desproteção deste composto. Em adição, mantiveram-se os sinais na região entre 6-7 ppm, provavelmente relacionados com a quercetina.

A CCD do produto, utilizando-se o intermediário III do método 8C, mostrou mancha com mesmo $R_f = 0,92$, portanto, muito próximo do valor encontrado para a quercetina nessa fase móvel (clorofórmio/metanol (1:2, v/v). Traços de produto parecem ter sido formados com o desaparecimento dos sinais das metilas do ácido málico protegido, em 1,52 e 1,53 ppm, e o surgimento dos sinais em torno de 4 ppm, relacionados com a OH primária do ácido L-málico (espectro 46). As principais evidências da presença da quercetina são os sinais próximos a ppm e entre 6-7 ppm.

Em todos os espectros, é possível observar sinal bem evidente próximo de 2 ppm, que pode estar relacionado com os hidrogênios do ácido acético, reagente necessário para a desproteção do ácido málico protegido.

O principal indício da obtenção do intermediário IV, a partir do intermediário III, proveniente do método 9, foi observado no espectro 47 (RMN ^1H), no qual não se identificaram sinais das metilas do ácido málico protegido em 1,54 e 1,53 ppm (H_4 e H_5). Os sinais observados entre 6-7 ppm podem ser dos hidrogênios do flavonóide. A CCD foi inconclusiva, pois apresentou mancha com o mesmo valor de R_f da quercetina (0,83) (clorofórmio/metanol (1:2, v/v).

Comparado com as metodologias que utilizaram o agente condensante DCC, o espectro resultante do método com EDC apresentou menos sinais, principalmente na região entre 1-2 ppm (relacionados com os hidrogênios do DCU). Consiste, portanto, em reação mais limpa, como o esperado.

4.2.3.1.6 Síntese do dendrímero III (contendo inositol, ácido L-málico e quercetina)

As reações de esterificação entre o intermediário IV e o inositol foram realizadas nesta etapa com o intuito de se obter o dendrímero de primeira geração de quercetina. Para isso, desenvolveram-se metodologias sintéticas e os rendimentos podem ser observados na Tabela XVIII.

Tabela XVIII: Características dos produtos obtidos nas tentativas de síntese do dendrímero de primeira geração de quercetina

Dendrimer III		
Método	Característica do produto	Rendimento bruto (%)
10	Sólido marrom	98
11	Sólido amarelo	46

O provável dendrímero de primeira geração de quercetina, resultante da metodologia 10A, foi analisado por RMN ^1H (espectro 48). Os principais sinais relacionados com o ácido L-málico apareceram entre 2-3 ppm. Neste espectro, o excesso de sinais decorrentes da impureza do produto prejudicou a análise nesta região. Na região de 4 ppm existem sinais que podem estar relacionados com o espaçante. Entre 6-7 ppm, os sinais podem ser da quercetina. O indício da presença do inositol neste produto foram os sinais próximos a 3,5 ppm.

A CCD do produto resultante do método 11 apresentou uma mancha com valor de $R_f = 0,83$, portanto, igual ao encontrado para a quercetina nas mesmas condições cromatográficas (clorofórmio/metanol (1:2, v/v)). Em adição, a análise do espectro de RMN de ^1H (espectro 49) mostra que a reação não foi obtida com sucesso, pois não foram visualizados sinais dos hidrogênios H_2 e H_3 do ácido L-málico e inositol.

4.2.3.2 Método divergente

O método divergente inicia-se com a síntese entre o foco central do dendrímero, portanto o inositol, com o ácido málico para que, por último, ocorra a ligação com a substância ativa. Esta abordagem sintética foi planejada no presente trabalho pelas duas razões mencionadas. Primeiramente, O NFOH é instável na presença de luz e temperatura superior a 50 °C. Sendo assim, o objetivo desta rota sintética é preservar esta molécula uma vez que, pelo método divergente, toda a malha dendrimerica será

construída para que, por último, ocorra a reação com o NFOH. Em adição, pretendeu-se comparar o resultado da síntese do dendrímero pelo método convergente e o composto correspondente obtido pela abordagem divergente.

4.2.3.2.1 *Síntese do intermediário V (inositol e ácido málico protegido)*

O intermediário V é formado pela esterificação entre o álcool e ácido carboxílico do inositol e ácido málico protegido, respectivamente. Este composto foi planejado com o intuito de se sintetizar a primeira geração do dendrímero pelo método divergente, ou seja, partindo-se do foco central. Foram dez diferentes metodologias desenvolvidas para a obtenção deste composto e os principais objetivos, características dos produtos obtidos e rendimentos brutos das reações podem ser observados na Tabela XIX.

TabelaXIX – Objetivos dos métodos de sínteses do intermediário V e as características dos produtos obtidos em cada metodologia desenvolvida

<div style="text-align: center;"> <p>Intermediário V</p> </div>			
Método	Objetivos	Característica do produto	Rendimento bruto (%)
12A	Obter o intermediário I com a utilização do agente condensante DCC	Óleo marrom	40
12B	Aperfeiçoar a metodologia 12B, purificando o intermediário I	Sólido marrom	5
12C	Aperfeiçoar a metodologia 12B, purificando o intermediário I	Sólido marrom	65
12D	Aperfeiçoar a metodologia 12B, purificando o intermediário I	Sólido marrom	-*
13A	Obter o intermediário I com a utilização do agente condensante EDC	Sólido marrom	5
13B	Aperfeiçoar metodologia 13A, variando o solvente e a temperatura reacional	Óleo amarelo	-*
13C	Aperfeiçoar metodologia 13A, variando o solvente e a temperatura reacional	Óleo amarelo	-*
14A	Obter o intermediário I com a utilização do agente condensante CDI	Sólido marrom	-*
14B	Aperfeiçoar metodologia 14A variando a temperatura do sistema reacional	Sólido marrom	-*
14C	Aperfeiçoar metodologia 14A	Sólido marrom	-*

* Rendimento maior que 100% devido à presença de impurezas na amostra

Na reação de esterificação entre o inositol e ácido málico protegido pelo método 12A utilizou-se o agente condensante DCC e o catalisador DMAP como reagentes para obtenção do produto desejado. A CCD do composto mostrou mancha principal com R_f de 0,79, diferente dos valores observados para os materiais de partida -- ácido L-málico ($R_f=0,43$) e ácido málico protegido ($R_f=0,57$). Em análise no IV (espectro 50), há indicações da obtenção do intermediário V pela presença das bandas características em 1793 cm^{-1} , de estiramento carbonila de lactona (com ácido málico protegido), e em 1767 cm^{-1} , correspondente a estiramento carbonila de éster. A banda registrada em

1701 cm^{-1} pode ser de estiramento carbonila de ácido carboxílico. O aparecimento desta banda pode representar a abertura do anel do ácido málico protegido durante a reação, o que não inviabiliza a etapa seguinte. Para a formação do intermediário II, a quebra do anel lactona e posterior liberação do grupo ácido são planejadas. Verificou-se, adicionalmente, banda na região de 1660 cm^{-1} , que pode ser de estiramento carbonila de amida presente no DCU.

O espectro de RMN ^1H (espectro 51) apresentou algumas evidências de que a síntese foi realizada com sucesso. A formação dos sinais em 1,57 e 1,62 ppm pode estar relacionada com os H_4 ou H_5 do ácido málico protegido, uma vez que estes valores estão próximos aos encontrados para o ácido málico padrão, 1,53 e 1,54 ppm, respectivamente. Pode-se observar que este espectro apresentou excesso de sinais porque o composto estava impuro. Porém, os sinais presentes na região próxima a 3 ppm podem estar relacionados com os hidrogênios do anel do inositol do composto sintetizado.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (espectro 52) indicou que, provavelmente, se obteve o produto desejado. Os sinais 25,27 e 24,88 ppm são próximos aos dos carbonos C_6 e C_7 do padrão ácido málico protegido (25,02 e 26,73 ppm, respectivamente).

Pretendeu-se, com a metodologia 12B, purificar o intermediário V antes da síntese do intermediário VI. Dessa maneira, a metodologia seguiu como descrita em 12A, utilizando DCC e DMAP como reagentes para esterificação. A CCD mostrou mancha principal com valor de R_f de 0,79. Assim como em 12A, no espectro de RMN ^1H (espectro 53), procuraram-se sinais relativos aos hidrogênios das metilas (H_4 e H_5) do ácido málico protegido. Verificaram-se dois em 1,62 e 1,56 ppm, portanto próximos aos observados no ácido protótipo. No espectro 54, de RMN ^{13}C , observaram-se os sinais 25,38 e 25,27 ppm em região semelhante à dos carbonos 6 e 7 do padrão de ácido málico protegido.

A CCD do produto obtido após 4 horas de reação mostrou duas manchas para o produto obtido em 12C. A principal delas apresentou R_f de 0,68, portanto, próximo aos observados nos procedimentos anteriores. A outra se deslocou como o material de partida - ácido málico protegido. As interpretações dos resultados de RMN deste

procedimento sintético foram realizadas conforme as metodologias 12A e 12B, ou seja, comparando-se os sinais do espectro 55 e 56 com os observados para ^1H e ^{13}C do ácido málico protegido padrão (isolado). Pode-se observar a formação do duplete característico, em 1,61 e 1,62 ppm, que pode ser relativo aos hidrogênios (H_4 e H_5) das metilas características do ácido málico protegido. Em adição, como nas discussões anteriores, no espectro de ^{13}C (espectro 63) apareceram os sinais em 25,27 e 25,39 ppm, úteis na identificação do produto desejado por indicar a presença dos carbonos 6 e 7 na estrutura do composto final obtido.

No espectro de RMN de ^1H (espectro 57) do produto resultante do método 12D, verificam-se sinais que podem estar relacionados com o produto desejado, por exemplo, em 1,52 e 1,53 ppm relativos aos H_4 e H_5 do ácido málico protegido. Além disso, existem sinais em 2,80 e 4,80 ppm, que também podem ser do espaçante. O sinal próximo a 3 ppm, correspondente aos hidrogênios do anel do inositol, sugere sua provável presença. Estes resultados indicam que o intermediário V foi obtido, porém com excesso de impureza, principalmente, na região entre 1-2 ppm.

Como uma nova abordagem sintética, principalmente para evitar a formação do produto secundário de difícil remoção DCU, desenvolveu-se o método 13A. Não se obteve sucesso na síntese do intermediário V obtido por esta metodologia, que utilizou como agente condensante o EDC. Este método foi adaptado daquele descrito por Damen e colaboradores (2000). Como se pode observar nos espectros 58 (RMN ^1H) e 59 (RMN ^{13}C) do produto isolado da reação, os sinais parecem estar relacionados apenas com o ácido málico protegido. É importante ressaltar que as sucessivas lavagens do produto com água para retirada do DMSO (solvente utilizado na reação), provavelmente, levaram à perda de produto, fazendo com que o rendimento bruto do sólido obtido fosse em torno de 5%. Além disso, durante as 24 horas de reação não se formou precipitado característico do produto secundário EDU em meio reacional. Se houve sua formação, este composto pode ter se solubilizado no DMSO.

Assim como em 13A, os métodos 13B e 13C também foram realizados empregando-se o agente condensante EDC, porém, seguindo a metodologia descrita por Kim e colaboradores (2008). A síntese pelo método 13B foi efetuada à temperatura ambiente, até 2 h e 30 minutos de reação. Após este período, aqueceu-se o sistema

para 41 °C, a fim de se melhorar a solubilidade dos reagentes em diclorometano. Já pelo método 13C, a reação ocorreu à temperatura ambiente, utilizando-se DMSO como solvente. As CCD de ambas as metodologias mostram duas manchas. A principal delas, com valor de R_f de 0,33, está, provavelmente, relacionada ao ácido málico protegido. A outra mancha, bem mais discreta, apresentou $R_f=0,68$, sendo, possivelmente, do intermediário desejado. É importante ressaltar que, assim como em 13A, o principal problema observado em 13C foram as sucessivas lavagens com água para retirada de DMSO. Este procedimento fez com que houvesse perda significativa de produto bruto.

Os espectros de ^1H de números 60 e 61 mostram os produtos destas reações e, assim como o observado para 13A, os sinais registrados parecem estar relacionados apenas com o ácido málico protegido.

A difícil solubilização do EDC em solventes orgânicos usuais, assim como as dificuldades em se trabalhar com DMSO, mas, principalmente, o insucesso na obtenção do intermediário V motivaram a busca por novos métodos para a sua síntese.

Neste contexto, os métodos 14A, 14B e 14C utilizaram o agente condensante CDI.

As CCD dos produtos obtidos nos métodos 14A e 14B mostrou uma mancha. A principal delas com $R_f = 0,33$, é, provavelmente, relacionada com o ácido málico protegido. Os espectros 62 e 63 (^1H) mostraram o insucesso da reação, pois não se observaram, com metodologia alguma, sinais na região próxima a 3 ppm, relativos aos hidrogênios do inositol.

O intermediário V não foi sintetizado no método 14C. O espectro de RMN de ^1H do produto resultante da extração com solução saturada de bicarbonato de sódio, água e solução saturada de cloreto de sódio (espectro 64), evidenciou a mistura de ácido málico protegido e de um derivado imidazólico (Figura 32). Os sinais em 1,61 e 1,62 ppm podem ser relativos aos hidrogênios H_4 e H_5 do ácido málico protegido e derivado, assim como o duplo dubleto em 2,89 e 2,93 ppm e duplo dubleto em 4,75 e 4,89 ppm. Entre 7 e 8 ppm, aparecem sinais que podem ser do imidazol (produto secundário da reação com CDI).

FIGURA 32 – Estruturas do ácido málico protegido e derivado imidazólico formados no método 14C.

4.2.3.2.2 Síntese do intermediário VI (inositol e ácido L-málico)

O intermediário ácido VI é formado pela desproteção do ácido málico. Este composto é importante para a etapa posterior, a reação de esterificação com a hidroxila da 3-hidroxi flavona, quercetina e NFOH para a formação do dendrímero de primeira geração. Os intermediários V, resultantes dos métodos 12A, 12C e 12D, foram utilizados como materiais de partida para esta etapa sintética.

O produto sintetizado a partir do método 12A foi analisado. A ausência dos sinais característicos próximos de 1,57 ppm no espectro de RMN ^1H (espectro 65) podem indicar a possível formação do composto. O produto está impuro, como verificado pelo excesso de sinais no espectro, principalmente na região entre 1-2 ppm.

A desproteção do grupo ácido foi realizada com o produto resultante do método 12C. Não se obteve sucesso no método, como observado no espectro 66, pois não estão evidentes os sinais do intermediário VI.

No espectro 67 (espectro de RMN ^1H), a ausência dos sinais em 1,52 e 1,53 ppm é o principal indício da desproteção dos grupos ácido e álcool do composto resultante do método 12D. Em adição, entre 3 e 4 ppm existem sinais que podem estar relacionado com o inositol e o sinal em 4,25 ppm pode ser da OH primária do ácido L-málico. Portanto, tais resultados sugerem que o intermediário VI foi sintetizado.

4.2.3.2.3 Síntese do dendrímero IV (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e 3-hidroxiflavona)

As reações de esterificação entre o intermediário VI e a 3-hidroxiflavona foram realizadas nesta etapa com o intuito de se obter o dendrímero de primeira geração deste flavonóide. Para isso, desenvolveram-se dois métodos sintéticos (16A e 16B). Em ambos, obteve-se sólido amarelo com 38 e 70% de rendimento bruto, respectivamente.

Os métodos 16A e 16B utilizaram como material de partida o intermediário VI proveniente da coluna cromatográfica (obtido a partir do método 12D) e a 3-hidroxiflavona na obtenção do dendrímero de primeira geração.

O método 16A foi realizado com base na metodologia de esterificação descrita por Damen e colaboradores (2000). O primeiro inconveniente deste procedimento foi o tempo de reação. O procedimento sintético durou 52 horas. Além disso, a CCD (metanol/clorofórmio (19:1, v/v) mostrou apenas uma mancha com R_f de 0,92, valor este semelhante ao observado para a 3-hidroxiflavona. Em adição, confirmando a hipótese do insucesso da reação, observa-se no espectro de RMN ^1H (espectro 68) ausência de sinais relativos aos hidrogênios do inositol, próximos a 3 ppm. O mesmo foi observado no espectro de RMN ^{13}C (espectro 69). Não há sinais na região de 70 ppm relacionados com os carbonos do foco central, inositol.

Assim como em 16A, o objetivo do método 16B foi sintetizar o dendrímero de primeira geração contendo 3-hidroxiflavona. Este método foi desenvolvido considerando-se o que foi apresentado na Patente (WO 2006/094357) (DUSTING *et al.*, 2006). Após 24 horas de reação, pode-se observar apenas uma mancha na CCD (metanol/clorofórmio (19:1, v/v) com R_f de 0,83, próximo ao encontrado para a 3-hidroxiflavona. Este resultado poderia indicar a formação de um produto que possui mesmo deslocamento que o material de partida ou o insucesso da reação. No IV (espectro 70) observou-se banda na região de 1738 cm^{-1} , característica de estiramento carbonila de ésteres. Porém, no RMN de ^1H (espectro 71), o sinal elevado da água próximo de 3 ppm prejudicou a análise do espectro. Adicionalmente, os sinais observados no espectro de ^{13}C (espectro 72) não foram suficientes para comprovar a obtenção do composto, mesmo que impuro.

4.2.3.2.4 Síntese do dendrímero V (dendrímero contendo inositol, ácido L-málico e NFOH)

As reações de esterificação entre o intermediário VI e o NFOH foram realizadas nesta etapa com o intuito de se obter o dendrímero de primeira geração deste derivado hidroximetilado. Para isso, desenvolveu-se a metodologia sintética 17. A análise da CCD e RMN de ^1H do produto obtido foi inconclusiva. A CCD (clorofórmio/metanol/ácido acético 85:10:5 v/v/v) apresentou apenas uma mancha, com valor de R_f igual ao do nitrofural (0,61). Já no espectro 73 o excesso de sinais, principalmente, na região entre 1-2 ppm, evidenciado a existência de impurezas. Os sinais na região de 2,5 ppm podem ser relativos ao H_2 do ácido L-málico. Em adição, os observados entre 3-4 ppm, podem ser do inositol. A região entre 4-5 ppm está com excesso de sinais, o que prejudica a análise. Sinais do NFOH ou NF podem ser: 7,19 (H_3), 7,73 (H_6), 7,80 (H_4), 11 (H_8).

4.3 TENTATIVAS DE PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS SINTETIZADOS

Como a maioria dos derivados obtidos mostrou impurezas, que dificultaram a identificação estrutural e o prosseguimento das reações, empregaram-se técnicas na tentativa de se obter compostos de alta pureza. Vale ressaltar que só a partir de derivados puros e completamente identificados se pode proceder aos ensaios de atividade biológica.

4.3.1 Dendrímeros de primeira geração de 3-hidroxiflavona e quercetina resultantes do método convergente

4.3.1.1 Cromatografia preparativa em camada delgada

As cromatografias preparativas em camada delgada foram realizadas com o prováveis dendrímeros de primeira geração de 3-hidroxiflavona e quercetina, obtidos com os método 4A e 10A. Primeiramente, CCD com 13 combinações diferentes de

solventes foram feitas em cromatoplaças de sílica-gel G-60 para se ter uma idéia da melhor fase móvel da cromatografia preparativa:

- ✓ Acetato de etila/hexano (1:1, v/v);
- ✓ Acetato de etila/hexano (2:1, v/v);
- ✓ Acetato de etila/hexano (1:2, v/v);
- ✓ Acetato de etila/hexano (90:10, v/v);
- ✓ Acetato de etila/tolueno (1:1, v/v);
- ✓ Acetato de etila/tolueno (1:2, v/v);
- ✓ Acetato de etila/tolueno (2:1, v/v);
- ✓ Acetona/hexano (1:1, v/v);
- ✓ Acetona/hexano (1:2, v/v);
- ✓ Acetona/hexano (2:1, v/v);
- ✓ Clorofórmio/metanol (2:1, v/v);
- ✓ Clorofórmio/metanol (1:19, v/v);
- ✓ Clorofórmio/metanol (1:1, v/v).

Para o produto de 4A, a fase móvel que proporcionou a melhor separação dos componentes da mistura foi hexano/acetato de etila 2:1, v/v. Já para 10A, duas tentativas de purificação foram realizadas com os seguintes sistemas solventes: acetato de etila/tolueno 1:2, (v/v) e acetato de etila/hexano 1:9, (v/v).

O espectro de RMN de ^1H (espectro 74) refere-se ao produto isolado a partir de 4A. Neste, observa-se que a fase móvel escolhida para este experimento não foi a mais adequada. A ausência de sinais nas regiões de 2,5 e 3 ppm é indício de que não existe espaçante e inositol no composto isolado da cromatografia.

O espectro de RMN de ^1H (espectro 75) refere-se ao do produto isolado a partir de 10A com a fase móvel acetato de etila/tolueno 1:2, v/v. Neste espectro, observa-se excesso de sinais, principalmente na região entre 1-2 ppm, que podem estar relacionados com o DCU. Portanto, este sistema solvente ainda não foi o mais adequado para a purificação deste composto. Mesmo assim, os sinais referentes ao ácido L-málico, inositol e quercetina estão no espectro, indicando o isolamento do

suposto dendrímero, ainda que em condições de pureza não totalmente adequadas. Já os observados entre 3-4 ppm podem ser do inositol e entre 6-7 ppm da quercetina.

O espectro de ^1H (espectro 76) refere-se ao produto isolado em acetato de etila/hexano 10:90, v/v, a partir de 10A. Os sinais existentes entre 1-2 ppm podem ser do subproduto DCU. Mais uma vez, a escolha da fase móvel para este sistema cromatográfico não foi a mais adequada. Porém, dentre os compostos isolados, houve um que possivelmente corresponde ao dendrímero de quercetina. Os sinais entre 6-7 ppm podem ser do flavonóide, assim como aqueles em 2,45 ppm, aqueles referentes ao ácido L-málico. A presença do inositol pode ser verificada principalmente pelo sinal em 3,37 ppm.

4.3.1.2 Recristalização

Como os resultados da cromatografia preparativa não foram satisfatórios, testes de recristalização do produto obtido em 10A foram feitos como nova alternativa para a purificação deste produto.

Na primeira tentativa, THF foi adicionado na amostra em quantidade suficiente para solubilizá-la. Na solução, juntaram-se, aproximadamente, 5 mL de hexano. A quente, houve solubilização completa do produto e, a frio, formou-se um óleo marrom. Portanto, como não se obteve um sólido como precipitado, optou-se pela realização do segundo ensaio, que utilizou acetato de etila para solubilizar o produto. Desta vez, a amostra ficou parcialmente solúvel no acetato, o que dificultou a separação, a frio, no hexano.

Na terceira tentativa, quantidade suficiente de metanol foi adicionada na amostra para solubilizá-la. Hexano foi adicionado como o solvente da recristalização e não se obteve sucesso nesta metodologia, porque não se formou precipitado a frio.

Na quarta tentativa, a amostra foi solubilizada na menor quantidade possível de metanol e a suspensão ficou em geladeira por 24 horas. Formou-se precipitado amarelo claro, portanto de coloração diferente do material de partida (marrom). O espectro de RMN de ^1H (espectro 77) deste composto amarelo foi realizado e podem-se observar os sinais evidentes da quercetina entre 6-7 ppm. Não apareceram sinais referentes ao

espaçante. O produto desejado não foi isolado e, portanto, este não foi o melhor método para se purificar o dendrímero de quercetina.

4.3.1.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Como não se obteve sucesso na recristalização do provável dendrímero obtido pelo método 10A, partiu-se para outra alternativa para a purificação dos compostos sintetizados. Para os estudos em CLAE (em cromatógrafo semipreparativo, marca Shimadzu), utilizaram-se quercetina, 3-hidroxiflavona, DCC, provável DCU, ácido L-málico, ácido málico protegido e os compostos finais dos métodos 4A e 10A.

As condições cromatográficas de cada composto analisado por CLAE estão descritas na Tabela XX.

Tabela XX – Condições cromatográficas dos compostos analisados por CLAE

Composto	Concentração (mg/mL)	Fluxo (mL/min)	Tempo de corrida (min)	Fase móvel	Comprimento de onda (nm)
quercetina	0,6	0,5	10	MeOH/ACN* (4:1, v/v)	314
	0,2	0,5	10	MeOH/ACN (4:1, v/v)	
	2	0,5	30	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	
	0,05	0,5	25	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	
	0,017	0,5	30	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	
	0,2	0,5	30	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	
3-hidroxiflavona	0,2	0,5	10	MeOH/ACN (4:1,v/v)	306
	2	0,5	25	MeOH/água/ACN (2:2:2, v/v/v)	
Ácido L-málico	0,2	0,5	10	MeOH/ ACN (4:1,v/v)	242
	2	0,5	25	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	
Ácido málico protegido	0,2	0,5	20	MeOH/ ACN (4:1,v/v)	224
	2	0,5	30	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	

Tabela XX – Condições cromatográficas dos compostos analisados por CLAE (cont.)

Composto	Concentração (mg/mL)	Fluxo (mL/min)	Tempo de corrida (min)	Fase móvel	Comprimento de onda (nm)
DCC	1	0,5	30	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	244
DCU	0,2 ^a	0,5	10	MeOH/ ACN (4:1, v/v)	250
	0,2 ^b	0,5	30	MeOH/ ACN (4:1, v/v)	
	0,5	0,5	30	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	
Provável dendrímero 4A	0,2	0,5	10	MeOH/ ACN (4:1, v/v)	314
	2	0,5	30	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	
	1	0,5	60	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	
	1	0,4	30	MeOH/água/ACN (1:0,5:1, v/v/v)	

Tabela XX – Condições cromatográficas dos compostos analisados por CLAE (cont.)

Composto	Concentração (mg/mL)	Fluxo (mL/min)	Tempo de corrida (min)	Fase móvel	Comprimento de onda (nm)
Provável dendrímero	20	0,5	10	MeOH/ ACN (4:1, v/v)	314
10A	0,2	0,8	20	MeOH/água/ACN (4:1:1, v/v/v)	
	0,2	0,8	20	MeOH/água/ACN (3:1:2, v/v/v)	
	0,2	0,5	30	MeOH/água/ACN (3:1:2, v/v/v)	
	2	0,5	60	MeOH/água/ACN (3:2:1, v/v/v)	
	2	0,5	30	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	
	2	0,8	60	MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v)	
	2	0,5	60	MeOH/água (1:1, v/v)	
	2	0,5	60	MeOH/água/ACN (1:1:1, v/v/v)	
	2	0,5	60	MeOH/água/ACN (3:3:1, v/v/v)	

* ACN=Acetonitrila

^a DCU resultante da reação de obtenção do dendrímero de primeira geração de 3-hidroxiflavona.^b DCU resultante da reação de obtenção do dendrímero de primeira geração de quercetina.

Os estudos em CLAE iniciaram com a fase móvel MeOH/ACN (1:1, v/v). Quercetina, 3-hidroxiflavona, ácido L-málico, ácido málico protegido, DCC, DCU e os produtos finais de 4A e 10A foram analisados nesta condição. Os melhores

cromatogramas podem ser vistos na Figura 33. À primeira vista, esta fase móvel pareceu ser interessante para a quercetina, 3-hidroxiflavona, produtos finais de 4A e 10A. Porém, os tempos de retenção dos flavonóides foram os mesmos que os encontrados para os sinais mais evidentes dos possíveis dendrímeros, o que fez com que novas combinações de solventes fossem investigadas.

FIGURA 33 – Cromatogramas obtidos com a fase móvel MeOH/ACN (1:1, v/v).

A segunda etapa do estudo foi realizada com o produto final de 10A. Testaram-se as fases móveis descritas na Tabela XX. A melhor separação dos componentes da mistura foi observada com a combinação MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v). Os principais cromatogramas obtidos nesta etapa estão na Figura 34.

FIGURA 34– Cromatogramas em diferentes fases móveis do produto final de 10A.

A melhor fase móvel na CLAE para o possível dendrímero de primeira geração de quercetina foi MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v). Dessa forma, fizeram-se os testes com

quercetina, ácido L-málico, ácido málico protegido, DCC e DCU na mesma condição cromatográfica. O tempo de retenção dos principais sinais destes compostos foram analisados.

Para o produto final de 10A, o tempo de retenção do principal sinal do cromatograma foi 8 minutos, portanto, diferente daqueles observados para os materiais de partidas e subproduto da reação de obtenção do dendrímero. Este é o principal indício de que estes compostos não são semelhantes. Os principais cromatogramas desta série de compostos e seus respectivos tempos de retenção, na fase móvel MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v), podem ser observados na Figura 35.

FIGURA 35– Cromatogramas em diferentes fases móveis do produto final de 10C.

Utilizando-se a fase móvel MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v), 26 corridas em CLAE do produto final de 10A foram realizadas. De cada cromatograma, o sinal principal em 8 minutos foi coletado. Após a rotaevaporação do solvente, obteve-se 0,021 g de produto, que foi analisado por RMN ^1H e ^{13}C . No espectro 78, de RMN ^1H , não existem os principais sinais relacionados com o inositol e ácido L-málico. No espectro 79, de RMN

^{13}C , podem-se observar apenas os sinais relativos à quercetina. Porém, a quantidade de amostra analisada pode ter sido insuficiente para a análise em RMN. Assim, estes resultados não foram conclusivos. Novos experimentos serão realizados para a confirmação destas informações.

Os estudos em CLAE para o produto final obtido em 4A estão em andamento e ainda não se conseguiu separar os componentes da mistura. Inicialmente, utilizou-se a fase móvel MeOH/água/ACN (2:2:1, v/v/v) por esta ter sido a melhor condição cromatográfica para 10A. Pode-se observar no cromatograma da Figura 36 que esta não foi a melhor fase móvel para este composto. Então, tentou-se a combinação MeOH/água/ACN (1:0,5:1, v/v/v), que também não gerou bom resultado. Portanto, novas análises para este produto serão realizadas para se alcançar a melhor separação dos componentes deste composto.

FIGURA 36– Cromatogramas em diferentes fases móveis do produto final de 4A.

4.3.1.4 Membrana de diálise

Utilizou-se membrana de diálise como tentativa adicional de purificação do produto resultante do método 10A. O principal objetivo desta metodologia foi retirar o produto secundário DCU. Assim, se esperaria que no espectro de RMN de ^1H desaparecessem os sinais entre 1-2 ppm. Como observado no espectro 80 (de RMN ^1H), os sinais nesta região foram identificados, o que levou à conclusão de que a técnica não foi eficiente. O mesmo pode ser visualizado no espectro 81 (de RMN ^{13}C). Os sinais entre 20-30 ppm são os principais indícios da presença de DCU na amostra.

4.3.2 Intermediário V resultante do método divergente

4.3.2.1 Cromatografia em coluna

Como houve indicações de que o intermediário V foi obtido pelo método 12B, tentativa de purificação do composto foi feita em cromatografia em coluna. Obteve-se quantidade pequena de amostra, com rendimento de 5%. Todo composto foi utilizado nas análises de RMN.

Os principais indícios de obtenção do intermediário V, após a coluna cromatográfica, foram: (1) sinais característicos do ácido málico protegido em 1,62 e 1,67 ppm, observado no espectro 82; (2) no espectro 83, de RMN ^{13}C , observaram-se os sinais 25,28 e 25,40 ppm dos carbonos 7 e 8 do padrão ácido málico protegido. Porém, verifica-se a manutenção dos sinais na região entre 1-2 ppm, mostrando que o procedimento não foi totalmente eficiente.

4.3.3 Intermediário VI resultante do método divergente

4.3.1 Cromatografia em coluna

Como houve indicações de que o intermediário VI foi obtido pelo método 12D, a tentativa de purificação do composto foi feita em cromatografia em coluna. CCD com doze combinações diferentes de solventes em cromatoplasas de sílica-gel G-60 foram realizadas para a escolha da melhor fase móvel do sistema cromatográfico:

- ✓ Acetato de etila/hexano (1:1, v/v);
- ✓ Acetato de etila/hexano (2:1, v/v);
- ✓ Acetato de etila/hexano (1:2, v/v);
- ✓ Acetato de etila/tolueno (1:1, v/v);
- ✓ Acetato de etila/tolueno (2:1, v/v);
- ✓ Acetato de etila/tolueno (1:2, v/v);
- ✓ Acetona/hexano (1:1, v/v);
- ✓ Acetona/hexano (2:1, v/v);

- ✓ Acetona/hexano (1:2, v/v);
- ✓ Clorofórmio/metanol (2:1, v/v);
- ✓ Clorofórmio/metanol (1:19, v/v);
- ✓ Clorofórmio/metanol (1:1, v/v).

A melhor fase móvel foi acetato de etila/hexano 1:1, v/v.

Os dados espectroscópicos de RMN ^1H do produto isolado da coluna cromatográfica podem ser visualizados no espectro 84. Existem indícios de que o produto esteja presente na amostra. Os sinais entre 3 e 4 ppm podem ser do inositol. A presença de muitos sinais entre 2-3 ppm prejudica a avaliação dos hidrogênios do ácido L-málico. No entanto, próximo de 4,26 ppm, existem sinais que podem ser da OH do espaçante. Na região entre 1-2 ppm existem sinais, que podem ser do subproduto DCU. Além do espectro de RMN de ^1H não ser conclusivo para o intermediário VI, o rendimento obtido após a realização da coluna cromatográfica foi de apenas 5%. Assim, este método não foi o mais adequado para a purificação do composto e novas tentativas serão realizadas para se obter este intermediário puro.

4.4 ESTUDOS DE FOTOESTABILIDADE DO NF E NFOH

Face aos dados de fotossensibilidade do NF, o que compromete a integridade de sua estrutura, decidiu-se determinar a fotoestabilidade do NFOH, em comparação com esse protótipo.

Os estudos de fotoestabilidade destes compostos foram realizados no meio água/metanol (1:1, v/v). Nestes ensaios, as amostras foram submetidas à exposição na luz durante 60 minutos e, em intervalos apropriados de tempo, alíquotas foram analisadas em CLAE.

Os perfis de fotodegradação do NF podem ser observados na Figura 37. Nesta pode-se verificar que, no tempo zero, existe apenas um sinal no cromatograma equivalente ao material de partida, com dois máximos de absorção no ultravioleta (UV) em 260 e 370 nm. Após 10 minutos de ensaio, apareceram 3 sinais no cromatograma. Os máximos de absorção para cada sinal foram: (1) sinal 1: 254 nm; (2) sinal 2: 260 e 370 nm e (3) sinal 3: 260 e 375 nm. Pode-se observar que os espectros de UV dos

compostos equivalentes aos sinais 2 e 3 são muito parecidos. Perfis idênticos nos cromatogramas e espectros de UV foram observados em 30, 45 e 60 minutos. Por essa razão, os espectros de UV destes intervalos não foram representados na Figura 37. Assim, estes primeiros resultados sugerem que a fotodegradação do NF acontece em até 10 minutos.

45 minutos

60 minutos

FIGURA 37 – Cinética de fotodegradação do NF em 254 nm (cont.).

Os perfis de fotodegradação do NFOH foram semelhantes aos do NF, como pode ser observado na Figura 38. No tempo zero, existe apenas um sinal no cromatograma equivalente ao material de partida, com dois máximos de absorção no UV em 265 e 375 nm. Após 10 minutos de ensaio, apareceram 3 sinais, com máximos de absorção de: (1) sinal 1: 250 nm; (2) sinal 2: 260 e 370 nm e (3) sinal 3: 265 e 375 nm. Perfis idênticos nos cromatogramas e espectros de UV foram observados nos intervalos de 20, 30, 45 e 60 minutos. Portanto, assim como para o NF, estes primeiros resultados sugerem que a fotodegradação do NFOH acontece em até 10 minutos.

FIGURA 38 – Cinética de fotodegradação do NFOH em 254 nm.

30 minutos

45 minutos

60 minutos

FIGURA 38 – Cinética de fotodegradação do NFOH em 254 nm(cont.).

CONCLUSÕES

"NADA HÁ COMO COMEÇAR PARA VER COMO É ÁRDUO CONCLUIR".

VÍCTOR HUGO

5 CONCLUSÕES

- ✓ Os estudos de modelagem molecular auxiliaram a compreensão do possível mecanismo de liberação do NFOH, 3-hidroxiavona e quercetina do pró-fármaco dendrimérico de primeira geração. A partir de quatro ramificações, o impedimento estérico sobre as carbonilas de interesse parece ser o principal parâmetro para a aproximação e, conseqüente, ação enzimática. Experimentos práticos serão realizados para validar estes resultados;
- ✓ Já para os pró-fármacos dendriméricos de segunda geração, os estudos de modelagem molecular foram realizados para se obter informações sobre as estabilidades estruturais dos sistemas. De um modo geral, quanto maiores os números de ramificações, mais estáveis os dendrímeros, provavelmente pela maior interação intramolecular;
- ✓ A dificuldade de remoção do subproduto DCU, formado com a utilização do DCC, fez com que diferentes métodos de síntese para o intermediário I fossem testados. Os melhores resultados foram os que não utilizaram este agente condensante;
- ✓ Possivelmente, obteve-se o intermediário II a partir dos produtos de 1C, 3C e 3E. Os melhores resultados desta etapa sintética de desproteção do ácido málico foram aqueles que partiram de métodos sem o uso de DCC como reagente. Em adição, não se obteve êxito na síntese do intermediário II resultantes dos métodos 3A e 3B, provavelmente devido à hidrólise do intermediário I nas condições reacionais aplicadas;
- ✓ A síntese do dendrímero de primeira geração de 3-hidroxiavona não foi bem-sucedida com o emprego dos métodos 5A e 5B e 7. Porém, existem indícios da obtenção do dendrímero com os métodos 4A e 6. O tempo de reação pode ter

influenciado estes resultados. Já as análises das porções aquosas dos métodos 5B e 7 sugerem que o dendrímero foi obtido;

- ✓ Provavelmente o intermediário III foi obtido pelos métodos 8A, 8B, 8C e 9;
- ✓ Possivelmente o intermediário IV foi sintetizado. O melhor resultado foi observado com o uso de EDC como agente condensante;
- ✓ A síntese do dendrímero de primeira geração com quercetina, possivelmente, foi realizada com sucesso empregando-se as metodologias 10 e 11;
- ✓ O intermediário V foi, provavelmente, sintetizado pelos métodos 12A, 12C e 12D. Cromatografia em coluna foi realizada para o produto resultante de 12B na tentativa de se purificar estes compostos. Os resultados sugerem a permanência do DCU, comprovando a dificuldade de remoção deste produto secundário;
- ✓ Provavelmente, obteve-se o intermediário VI, a partir do intermediário V obtido em 12D;
- ✓ Duas metodologias foram desenvolvidas para a síntese do dendrímero de primeira geração com 3-hidroxiflavona pelo método divergente, 16A e 16B. Os resultados sugerem que o dendrímero não foi obtido;
- ✓ Os resultados da síntese do dendrímero de primeira geração de NFOH pelo método 17 foram inconclusivos. Enquanto a CCD apresentou apenas uma mancha relacionada com o NF, o espectro de RMN de ^1H apresentou sinais que podem ser do produto desejado. Novas análises deverão ser realizadas para caracterizar este produto;

- ✓ Diferentes métodos de purificação – CLAE, cromatografia em coluna, recristalização e diálise -- foram empregados para os dendrímeros de primeira geração de 3-hidroxiflavona e quercetina, bem como para o intermediário I, V e VI. No entanto, apenas para o intermediário I o resultado foi satisfatório;
- ✓ Estudos de fotodegradação foram realizados com o NF e NFOH, os quais mostraram perfis semelhantes. Novos experimentos serão realizados para complementar os resultados deste trabalho.

PERSPECTIVAS

“EMBORA NINGUÉM POSSA VOLTAR ATRÁS E FAZER UM NOVO COMEÇO, QUALQUER
UM PODE COMEÇAR AGORA E FAZER UM NOVO FIM”.

CHICO XAVIER

6 PERSPECTIVAS

- ✓ Desenvolver metodologia de purificação eficiente para os dendrímeros de primeira geração de 3-hidroxiavona e quercetina sintetizados;
- ✓ Uma vez puros os dendrímeros, determinar a atividade tripanomicida, leishmanicida e realizar estudos de liberação destes compostos;
- ✓ Desenvolver metodologia sintética e de purificação para derivados dendriméricos de NFOH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

"QUANTO MAIOR NOSSO CONHECIMENTO, MAIS EVIDENTE FICA NOSSA
IGNORÂNCIA".

JOHN F. KENNEDY

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUSSAFY, C.L.; JONES, B.P.; PRICE, K.E.; HARDINK, M.A.; McLAUGHLIN, R.W.; LILLIE, B.M.; HAWKINS, J.M.; VAIDYANATAN, R. DBU Catalysis of *N,N'*-carbonyldiimidazole mediates amidations. *Organic Letters*, v.12, p.324-327, 2010.
- AMIR, R. J.; PESSAH, N.; SHAMIS, M.; SHABAT, D. Self-immolative dendrimers. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, v.42, p.42, 4494-4499, 2003.
- ANDRADE, Z.A.; BRENER, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.11, p.222-228, 1969.
- ANDRADE, S.G.; CAMPOS, R.F.; SOBRAL, S.C.; MAGALHÃES, J.B.; GUEDES, R.S.P.; GUERREIRO, M.L. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myosites in mice. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, p.1-8, 2006.
- ASTELBAUER, A.; WALOCHNIK, J. Antiprotozoal compounds: state of the art and new developments. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.38, p.118-124, 2011.
- ASSAFA, P.; KATZHENDLERB, J.; HAJ-YEHIAA, A.I. 2-(4-Carboxyphenyl)-6-N,N-diethylaminobenzofuran: a useful reagent for the sensitive determination of alcohols by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A*, v.869, p.243-250, 2000.
- AULENTA, F.; HAYES, W.; RANNARD, S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *European Polymer Journal*, v.39, p.1741-1771, 2003.

Referências Bibliográficas

- BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N.J. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, v.25, p.203-211, 2007.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal: as bases moleculares da terapêutica*. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, v.1, 2008, 536p.
- BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. *Química Nova*, v.20, p.300-310, 1997.
- BERMAN, J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.16, 397-401, 2003.
- BHATTACHARYA, S.K.; SINHA, P.K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; JHA, T.K.; PANDEY, K.; DAS, V.R.; KUMAR, N.; LAL, C.; VERMA, N.; SINGH, V.P.; RANJAN, A.; VERMA, R.B.; ANDERS, G.; SINDERMAN, H.; GANGULY, N.K. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, v.196, p.591-8, 2007.
- BOAS, U.; HEEGAARD, P.M.H. Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews*, v.33, p.43-63, 2004.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, v.27, p.347-382, 1973.
- BU, J.; JUDEH, Z.M.A.; CHING, C.B.; KAWI, S. Epoxidation of olefins catalyzed by Mn(II) salen complex anchored on PAMAM-SiO₂ dendrimer. *Catalysis Letter*, v. 85, p.183-187, 2003.
- BUHLEIER, E.; WEHNER, W.; VÖGTLE F. Cascade and non-chain-like syntheses of molecular cavity topologies. *Synthesis*, v.2, p.155-158, 1978.

Referências Bibliográficas

BUNDGAARD, H. *Design of prodrugs*. Elsevier: Amsterdam, 1985.

CADDICK, S.; MUSKETT, F.W.; STONEMAN, R.G.; WOOLFSON, D.N. Synthetic ligands for apo-neocarzinostatin. *Journal of the American Chemical Society*, v.128, p.4204-4205, 2006.

CAI, Q.; ZHAO, Y.L.; BEI, J.Z.; XI, F.; WANG, S.G. Synthesis and properties of star-shaped polylactide attached to poly (amidoamine) dendrimer. *Biomacromolecules*, v.4, p.828-834, 2003.

CAMANDAROBA, E.L.; PINHEIRO, L.C.M.; ANDRADE, S.G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.44, p.97-103, 2002.

CANÇADO J. P. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, p. 29-37, 2002.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução à modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Química Nova*, v.26, p.428-438, 2003.

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

CHRISTIE, W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Advances in Lipid Methodology – Two*, p.69-111, 1993.

Referências Bibliográficas

- CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. O processo da latenciação no planejamento de fármacos. *Química Nova*, v.22, p.75-84, 1999.
- CHUNG, M.C; FERREIRA, E.I; SANTOS, J.L; GIAROLLA, J; RANDO, D.G; ALMEIDA, A.E; BOSQUESI, P.L; MENEGON, R.N; BLAU, L Prodrugs for the treatment of neglected diseases. *Molecules*, v.13, p.616-677, 2008.
- CHUNG, M.C. *Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofurais e primaquina potencialmente antichagásicos*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.135, 1996. [Tese de Doutorado].
- CHUNG, M.C.; GÜIDO, R.V.C.; MARTINELLI, T.F.; GONÇALVES, M.F.; POLLI, M.C.; BOTELHO, K.C.A.; VARANDA, E.A.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E.I. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone produg. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.11, p.4779-4783, 2003.
- CHUNG, M.C.; GONCALVES, M.F.; COLLI, W.; FERREIRA, E.I.; MIRANDA, M.T. M. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic dipeptide prodrugs of primaquine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.86, p.1127-1131, 1997.
- CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas no transporte de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.155-179, 2005.
- CLAYTON, J. Chagas disease 101. *Nature*, p.s4-s5, 2010a.
- CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature*, p.s12-s15, 2010b.
- CLONINGER, M.J. Biological applications of dendrimers. *Chemistry and Biology*, v.6, p.742-748, 2002.

Referências Bibliográficas

- COHEN, N. C. The molecular modeling perspective in drug design. In:_____. *Guidebook on molecular modeling in drug design*, California: Academic Press, 1988. p.1-17, 60-61.
- COURA, J.R. Determinantes epidemiológicos da doença de Chagas no Brasil: a infecção, a doença e sua morbi-mortalidade. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, p.392-402, 1988.
- COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.102, p.113-122, 2007.
- COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, p.3-24, 2002.
- COURA, J.R.; DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, p.31-40, 2009.
- COURA, J.R.; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, p.s6-s7, 2010.
- CRAMPTON, H.L.; SIMANEK, E.E. Dendrimers as drug delivery vehicles: non-covalent interactions of bioactive compounds with dendrimers. *Polymer International*, v.56, p.489-496, 2007.
- CRENSHAW, C.A.; GLANGES, E.; STUART, B.H.; PIERCE, J. Nitrofurazone therapy in "middle burns": a review. *Current Therapeutic Research Clinical and Experimental*, v.19, p.487-492, 1976.

Referências Bibliográficas

- CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, v.123, p.399-410, 2006.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.19, p. 111-126, 2006.
- DAMEN, E.W.; WIEGERINCK, P.H.; BRAAMER, L.; SPERLING, D.; De Vos D, SCHEEREN, H.W. Paclitaxel esters of malic acid as prodrugs with improved water solubility. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.8, p.427-432, 2000.
- 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*, 2010.
- D'EMANUELE, A.D.; ATTWOOD, D. Dendrimer-drug interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.57, p.2147-2162, 2005.
- D'EMANUELE, A.; JEVPRASESPHANT, R.; PENNY, J.; ATTWOOD, D. The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, v.95, p.447-453, 2004.
- de GROOT, F. M.; ALBRECHT, C.; KOEKKOEK, R.; BEUSKER, P. H.; SCHEEREN, H. W. Cascade-release dendrimers" liberate all end groups upon a single triggering event in the dendritic core. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, v.42, p.4490-4494, 2003.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.27, p.305-318, 2004.

Referências Bibliográficas

- 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 CARLO, G.; MASCOLO, N.; LZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences*, v.65, p.337-353. 1999.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutics agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Reviews of Infections Disease*, v.6, p.223-238, 1984.
- DOHERTY, D. *MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software - User's Guide*, version 3.2, The Chem21 Group Inc.: Lake Forest, IL, 1997.
- DORIGUETTO, A.C.; PAULA SILVA, C.H.T.; ELLENA, J.; TROSSINI, G.H.G.; CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. 5-Nitro-2-furaldehyde N-(hydroxymethyl)semicarbazone. *Acta Crystallographica Section E*, v.61, p.2099-2101, 2005.
- DREW, M.E.; LANGFORD, C.K.; KLAMO, E.M.; RUSSELL, D.G.; KAVANAUGH, M.P.; LANDFEAR, S.M. Functional expression of a *myo*-inositol/H1 symporter from *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biology*, v.15, p.5508-5515, 1995.
- DUSCHAK, V.D.; COUTO, A.S. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, v.2, p.19-51, 2007.
- DUSTING, J.G.; WOODMAN, L.O.; JARROTT, B.; MAY, N.C. Flavonoid compounds and uses thereof. AU Pat. 094357, 14 set. 2006.
- EGMAN, D.M.; LEON, J.S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Tropica*, v.81, p.123-132, 2002.

Referências Bibliográficas

- EINICKER-LAMAS, M.; ALMEIDA, A.C.; TODOROV, A.G.; CASTRO, S.L.; CARUSO-NEVES, C.; OLIVEIRA, M.M. Characterization of the *myo*-inositol transport system in *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Biochemistry*, v.267, p.2533-2537, 2000.
- EINICKER-LAMAS M.; MALAQUIAS, A.T.; DE CASTRO, S.; SMITH, G.A.; OLIVEIRA, M.M. Effects of fluorinated inositols on the phosphoinositides metabolism and the proliferation of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, v.85, p.232-238, 1999.
- EINICKER-LAMAS, M.; NASCIMENTO, M.T.C.; MASUDA, C.A.; OLIVEIRA, M.M.; CARUSO-NEVES, C. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: Regulation of *myo*-inositol transport by effectors of protein kinases A and C. *Experimental Parasitology*, v.117, p.171-177, 2007.
- EL-SAYED, N.M; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A.; DELCHER, A.L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S.J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G.C.; BRANCHE, C.; HAAS, B. ANUPAMA, A.; ARNER, E.; SLUND, L.A.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D.A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; SILVEIRA, J.F.; JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P.T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A.C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M.J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C.R.; MCCULLOCH, R.; MCKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J.C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J.L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, D.O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A.J.; SISK, E.; TAMMI, M.T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; AKEN, S.V.; VOGT, C.; WARD, P.N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C.M.; STUART, K.D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, v.309, p.209-415, 2005.

Referências Bibliográficas

- ESFAND, R.; TOMALIA, D.A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical application. *Drug Discovery Today*, v.6, p.427-436, 2001.
- ETTMAYER, P.; AMIDON, G.L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.47, p.2393, 2004.
- FISHER, M.; VÖGTLE, F. Dendrimers: from design to application: a progress report. *Angewandte Chemie International Edition*, v.38, p.884-905, 1999.
- FORSYTHE, K.H.; HOPFINGER, A.J. The Influence of solvent on the secondary structures of poly(L-alanine) and poly(L-proline). *Macromolecules*, v.6, p.423-437, 1973.
- FRAIHA NETO, H.; VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; PINTO, A.Y.N. Doença de Chagas - endêmica na Amazônia? *Anais Academia de Medicina Pará*, v.6, p.53-57, 1995.
- FRANÇA, C.F.C. *Andrejus Korolkovas Dicionário terapêutico Guanabara*, edição 2010/2011, São Paulo: Guanabara Koogan, 2010, p.18.8.
- FRIIS, G.J.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U., Eds. *A textbook of drug design and development*. Amsterdam: Harwood Academic, 1996. p. 351-385.
- GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today*, v.7, p.240-244, 1991.

Referências Bibliográficas

- GARCIA, E.S.; DVORAK, J.A. Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.31, p.259-262, 1982.
- Gaussian 03W for Windows*, version 6; Gaussian Inc.: Pittsburgh, PA, 1995-2003.
- GIAROLLA, J. *Pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofurais potencialmente antichagásicos*. Estudo de condições sintéticas para a primeira geração. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. [Dissertação de Mestrado].
- GIAROLLA, J.; FERREIRA, E.I. Pró-fármaco dendrimérico, Processo para sua preparação e composições contendo os mesmos. Protocolo de nº. 018070068714 junto à delegacia do INPI. 2008.
- GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; RANDO, D.G.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling study on the disassembly of dendrimers designed as potential antichagasic and antileishmanial prodrugs. *Journal of Molecular Modeling*, 2011.
- GIAROLLA, J.; RANDO, D.G.; PASQUALOTO, K.F.M.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling as a promising tool to study dendrimer prodrugs delivery. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v.939, p.133-138, 2010.
- GINGRAS, M.; RAIMUNDO, J.M.; CHABRE, Y.M. Cleavable dendrimers. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, v.46, p.1010-1017, 2007.
- GRAYSON, S.M.; FRÉCHET, J.M.J. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to application. *Chemical Reviews*, v.101, p.3819-3867, 2001.

Referências Bibliográficas

- GREEN, D.L.C.; KIDDLE, J.J.; THOMPSON, C.M. Stereochemistry of remote dianion addition to imines. Application to the synthesis of (1S, 8aS)-1-hydroxyindolizidine. *Tetrahedron*, v.51, p.2865-2874, 1995.
- GÜIDO, R.V.C.; FERREIRA, E.I.; NASSUTE, J.C.; VARANDA, E.A.; CHUNG, M.C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao NF (nitrofurazona). *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v.22, p.319-333, 2001.
- HAAG, R.; KRATZ, F. Polymer Therapeutics: Concepts and applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, v.45, p. 1198-1215, 2006.
- HABA, K.; POPKOV, M.; SHAMIS, M.; LERNER, R.A.; BARBAS III, C.F.; SHABAT, D. Single-triggered trimeric prodrugs. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, v.117, p.726-730, 2005.
- HAWKER, C.J.; FRÉCHET, J.M.J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, v.112, p.7638-7647, 1990.
- HENDERSON, G.B.; ULRICH, P.; FAIRLAMB, A.H.; ROSENBERG, I.; PEREIRA, M., SELA, M.; CERAMI, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.85, p.5374-5378, 1988.
- HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. *Lancet*, v.354, p.1191-1199, 1999.
- HOET, S.; STEVIGNY, S.; BLOCK, S.; OPPERDOES, F.; COLSON, P.; BALDEYROU, B.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Alkaloids from *Cassythia filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Medica*, v.70, p.407-413, 2004.

Referências Bibliográficas

- HOFT, D.F.; FARRAR, P.L.; KRATZ-OWENS, K.; SHAFFER, D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infection and Immunity*, v.64, p.3800-3810, 1996.
- HÖLTJE, H.D.; FOLKERS, G. Small molecules. In: _____ *Molecular modeling*. New York: VCH, 1997. p. 9-63, p.109-111.
- HUSSAIN, M.A.; LIEBERT, T.; HEINZE, T. Acylation of cellulose with *N,N'*carbonyldiimidazole-activated acids in the novel solvent dimethylsulfoxide/tetrabutylammonium fluoride. *Macromolecular Rapid Communications*, v.25, p.916-920, 2004.
- HYPERCHEM PROGRAM RELEASE 7 for Windows, Hypercube, Inc.: Gainesville, FL, 2002.
- ICH, Photostability Testing of New Drug Substances and Products (Q1B). International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 1996.
- IUPAC, INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Compendium of chemical terminology, second ed. (the "Gold Book"). Compiled by A.D. McNaught, A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997. XML on-line corrected version: <<http://goldbook.iupac.org>> created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata, updates compiled by A. Jenkins, ISBN 0-9678550-9-8. doi: 10.1351/goldbook, 2006.
- JAIN, K.; KESHARWANI, P.; GUPTA, U.; JAIN, N.K. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *International Journal of Pharmaceutics*, v.394, p.122-142, 2010.

Referências Bibliográficas

- JACOBS, R.T.; DING, C. Chapter 17 – Recent Advances in Drug Discovery for Neglected Tropical Diseases Caused by Infective Kinetoplastid Parasites. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, v.45, p.277-294, 2010.
- JUÁREZ, M.P.; FERNÁNDEZ, G.C. Cuticular hydrocarbons of triatomines. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v.147, p.711-730, 2007.
- JUNQUEIRA, A.C.V.; ALBAJAR, P.V.; COURA, J.R. Doença de Chagas na Amazônia Brasileira. In: COURA, J.R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, p.595-601.
- KAYSER, O.; KIDERLEN, E.A.F.; CROFT, E.S.L. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, v.90, p.55-62, 2003.
- KIM, J.H.; SIM, G.S.; BAE, J.T.; OH, J.Y.; LEE, G.S.; LEE, D.H.; LEE, B.C.; PYO, H.B. Synthesis and anti-melanogenic effects of lipoic acid-polyethylene glycol ester. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.60, p.863-870, 2008.
- KLAJNERT, B.; BRYSEWSKA, M. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica*, v.48, p.199-208, 2001.
- KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*. New York: Wiley-Interscience, 1988.
- LANGER, R. Drug delivery and targeting. *Nature*, v.392, p.5-10, 1998.
- LANGFORD, C.K.; EWBANK, S.A.; HANSON, S.A.; ULLMAN, B.; LANDFEAR, S.M. Molecular characterization of two genes encoding members of the glucose transporter superfamily in the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.55, p.51-64, 1992.

Referências Bibliográficas

- LA-SCALEA, M. A. . Mecanismo de ação biológica de nitroimidazóis e seu comportamento voltamétrico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.34, p.59-75, 1998.
- LA-SCALEA M.A.; CHUNG, M.C.; CRUZ, M.L.; SERRANO, S.H.; FERREIRA, E.I. Dissociation and electrooxidation of primaquine diphosphate as an approach to the study of anti-chagas prodrugs mechanism of action. *Bioelectrochemistry*, v.53, p.55-59, 2001.
- LEWARS, E.G. Molecular mechanics, In: _____, Ed. *Computational Chemistry, Introduction to theory and applications of molecular quantum mechanics*. Canada: Springer, 2011, 664p.
- LI, X.; SU, Y.; CHEN, Q.; LIN, Y.; TONG, Y.; LI, Y. Synthesis and characterization of biodegradable hyperbranched poly(ester-amide)s based on natural material. *Biomacromolecules*, v.6, p.3181-3188, 2005.
- LINDOSO, J.A.L; LINDOSO, A.A.B.P. Neglected tropical disease in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.51, p.247-253, 2009.
- LINSE, P. Molsim. Disponível em: <http://130.235.71.204/Molsim/Molsim.htm>. Acesso em: 27 janeiro 2012.
- LIU, M.; FRÉCHET, J.M.J. Designing dendrimers for drug delivery. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, v.2, p.393-401, 1999.
- MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitology Today*, p.119-124, 1998.
- MALTEZOU, H.C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v.2010, p.617521, 2010.

Referências Bibliográficas

- MALTEZOU, H.C. Visceral leishmaniasis: advances in treatment. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, v.3, p.192-8, 2008.
- MALTEZOU, H.C.; SIAFAS, C.; MAVRIKOU, M.; SPYRIDIS, P.; STAVRINADIS, C.; KARPATIOS, T.; KAFETZIS, D.A. Visceral leishmaniasis during childhood in Southern Greece. *Clinical Infectious Disease*, v.31, p.1139-43, 2000.
- MANACH, C.; DONOVAN, J.L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*, v.38, p.771-785, 2004.
- MANNING-CELA, R.; JAISHANKAR, S.; SWINDLEB, J. Life-cycle and growth-phase-dependent regulation of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Medical Research*, v.37, p.593–601, 2006.
- MANTELL, S.J. Amino acid derivatives. US Pat. 057767, 11 nov. 2007. 36p.
- MARIN-NETO, J.A.; SIMÕES, M.V.; SARABANDA, A.V.L. Forma crônica cardíaca. In: BERNER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. Eds. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 266-296.
- MARLES, R.J.; FARNSWORTH, N.R.; NEILL, D. A. Isolation of a novel cytotoxic polyacetylene from a traditional anthelmintic medicinal plant, *Minquartia guianensis*. *Journal of Natural Products*, v.52, p.261-266, 1989.
- MATTHEWS, O.A.; SHIPWAY, A.N.; STODDART, J.F. Dendrimers: branching out from curiosities into new technologies. *Progress in Polymer Science*, v.23, p.1-56, 1998.
- MATTOCK, N. Public/private partnership: developing an oral treatment for visceral leishmaniasis. *TDR News*, v.60, p.1-2, 1999.

Referências Bibliográficas

- MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v.146, p.601-620, 2007.
- McCONVILLE, M.J.; FERGUSON, M.A.J. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochemical Journal*, v.294, p.305-324, 1993.
- McCARTHY, T.D.; KARELLAS, P.; HENDERSON, S.A.; GIANNIS, M.; O'KEEFE, D.F.; HEERY, G.; PAULL, J.R.A.; MATTHEWS, B.R.; HOLAN, G. Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. *Molecular Pharmaceutics*, v.2, p.312-318, 2005.
- McGRATH, D. V. Dendrimer disassembly as a new paradigm for the application of dendritic structures. *Molecular Pharmaceutics*, v.2, p.253-263, 2005.
- McWATT, M.; BOONS, G.J. Parallel combinatorial synthesis of glycodendrimers and their hydrogelation properties. *European Journal of Organic Chemistry*, v.13, p.2532-2545, 2001.
- MEYER, P. Discovering new drugs. In: WERMUTH, C.G., Ed. *The practice of medicinal chemistry*. London: Elsevier, 1996. p. 11-24.
- MICHALICK, M.S.M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. *Parasitologia humana*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998. cap.6, p.34-40.

Referências Bibliográficas

- Ministério da Saúde. *Brasil dobrará produção de remédios contra mal de Chagas para atender outros países*, 2011. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2011/10/19/brasil-dobrara-a-producao-de-medicamentocontra-chagas>. Acesso em: 27 dez 2011.
- MINTZER, M.A.; GRINSTAFF, M.W. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chemical Society Reviews*, v.40, p.173-190, 2011.
- MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M.I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.100, p.663-677, 2006.
- MOREL, C.M. Reaching maturity – 25 Years of the TDR. *Parasitology Today*, v.16, p.522-525, 2000.
- MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M.M. O controle da transmissão transfusional. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.44, p.64-67, 2011.
- MUKHERJEE, S.; PATRA, S.S.; SARKAR, D. Dendrimers: a novel approach in nano drug delivery. *Journal of Pharmacy and Healthcare Management*, v.2, p.51-60, 2011.
- MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v.366, p.1561-1577, 2005.
- NAJLAH, M.; FREEMAN, S.; ATTWOOD, D.; D' EMANUELE, A. Synthesis, characterization and stability of dendrimer prodrugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.308, p.175-182, 2006.

Referências Bibliográficas

- NAJLAH, M.; FREEMAN, S.; ATTWOOD, D.; D'EMANUELE, A. *In vitro* evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.336, p.183-190, 2007a.
- 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, 2007b.
- NEUBER, H. Leishmaniasis. *Journal of the German Society of Dermatology*, v.6, p.754-765, 2008.
- NEWKOME, G.R.; YAO, Z.Q.; BAKER, G.R.; GUPTA, V.K. Micelles. Part 1. Cascade molecules. A new approach to micelles. *Journal of Organic Chemistry*, v.50, p.2003-2004, 1985.
- NIKAWA, J.; TSUKAGOSHI, Y.; YAMASHITA, S. Isolation and characterization of two distinct *myo*-inositol transporter genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, v.266, p.11184–11191, 1991.
- NISHIYAMA, N.; IRIYAMA, W.-D. JANG, A.; MIYATA, K.; ITAKA, K.; INOUE, Y.; TAKAHASHI, H.; YANAGI, Y.; TAMAKI, Y.; KOYAMA, H.; KATAOKA, K. Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. *Nature materials*, v.4, p.934–941, 2005.
- OLIVEIRA, M.M.; EINICKER-LAMAS, M. Inositol metabolism in *Trypanosoma cruzi*: potential target for chemotherapy against Chagas' disease. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.72, p.413-419, 2000.
- ONG, W.; MCCARLEY, R.L. Redox-driven shaving of dendrimers. *Chemical communications (Cambridge, England)*, p.4699-4701, 2005.

Referências Bibliográficas

- OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*, v.7, p.257-266, 2004.
- PATEL, T.D.; PARIKH, B.N.; GOTH, G.D.; DAVE, J.B.; PATEL, C.N. A review on pharmaceutical and non pharmaceutical applications of dendrimer. *Journal of Global Pharma Technology*, v.2, p.5-7, 2010.
- PATRICK, G. L. Computer in medicinal chemistry, In: _____, Ed. *An introduction to medicinal chemistry*. New York: Oxford, 2008, p.163-184.
- PAVLI, A.; MALTEZOU, H.C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases*, v.14, p.e1032-e1039, 2010.
- PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. *Opinion in Chemical Biology*, v.5, p.447-451, 2001.
- PINTO, A.Y.N.; HARADA, G.S.; VALENTE, V.C.; ADUB, J.E.A.; GOMES, F.S.; SOUZA, C.R.; VALENTE, S.A.S. Acontecimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.34, p.413-419, 2001.
- PINTO, A.Y.N.; VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; FERREIRA-JUNIOR, A.G.; COURA, J.R. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.41, p.602-614, 2008.
- PISCOPO, T.V.; AZZOPARDI, C.M. Leishmaniasis. *Postgraduate Medical Journal*, v.82, p.649-657, 2006.

Referências Bibliográficas

- PIZZI T. Effect of primaquine on experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.78, p.643-644, 1951.
- PORCAL, W.; HERNÁNDEZ, P.; BOIANI, M.; AGUIRRE, G.; BOIANI, L.; CHIDICHIMO, A.; CAZZULO, J.J.; CAMPILLO, N.E.; PAEZ, J.A.; CASTRO, A.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; DAVIES, C.; BASOMBRÍO, M.A.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. *In vivo* anti-chagas vinylthio-, vinylsulfinyl-, and vinylsulfonylbenzofuroxan derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.50, p.6004-6015, 2007.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infectious Diseases*, v.1, p.92-100, 2001.
- PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R.M.; KHAN, I.A.; NAVARRO, V.S.; VASAVADA, B.C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *International Journal of Cardiology*, v.115, p.279-283, 2007.
- RAETHER, W.; HANEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitology Research*, v.90, p.19-39, 2003.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. *Lancet*, v.375, p.1388-402, 2010.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Disease*, v.17, p.581-596, 2007.
- REZENDE, J.M.; MOREIRA, H. Formas digestivas da doença de Chagas. In: BERNER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.297-343.

Referências Bibliográficas

- ROSS, J.A.; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, v.22, p.19-34, 2002.
- SADLER, K.; TAM, J.P.; Peptide dendrimers: applications and synthesis. *Journal of Biotechnology*, v.90, p.195-229, 2002.
- 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.
- SCHLICK, T. *Molecular modeling and simulation: an interdisciplinary guide*. 2 ed. New York: Springer, 2010, 723p.
- SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.102, p.75-85, 2007.
- SEEBACH, D.; HERRMANN, G.F.; LENGWEILER, U.D.; BACHMANN, B.M.; AMREIN, W. Synthesis and enzymatic degradation of dendrimers from (R)-3-hydroxybutanoic acid and trimesic acid. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, v.108, p.2969-2972, 1996.
- SEN, S.E.; ANLIKER, K.S. ^1H NMR analysis of *R/S* ibuprofen by the formation of diastereomeric pairs. *Journal of Chemical Education*, v.73, p.569-572, 1996.
- SHABAT, D. Self-immolative dendrimers as novel drug delivery platforms. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v.44, p.1569–1578, 2006.
- SHAMIS, M.; LODE, H.N.; SHABAT, D. Bioactivation of self-immolative dendritic prodrugs by catalytic antibody 38C2. *Journal of the American Chemical Society*, v.126, p.1726-1731, 2004.

Referências Bibliográficas

- SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MARCONDES, C.B.; GUEDES, L.A.; SIQUEIRA, G.S.; BARONE, A.A.; DIAS, J.C.; AMATO, N.V.; TOLEZANO, J.E.; PERES, B.A.; ARRUDA, J.E.R.; LOPES, M.H.; SHIROMA, M.; CHAPADEIRO, E. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.33, p.351-357, 1991.
- SHUKLA, A.K.; SINGH, B.K.; PATRA, S.; DUBEY, V.K. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.160, p.2208-2218, 2010.
- 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.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 3^a ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, p. 501, 2001.
- SIMONS, A. L.; RENOUF, M.; HENDRICH, S.; MURPHY, P. A. Human gut microbial degradation of flavonoids: structure-function relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.4258-4263, 2005.
- SILVA, T. H. A. Modelagem molecular com o auxílio do computador. In: PRADO, M.A.F.; BARREIRO, E.J. *Prácticas de química farmacêutica y medicinal*. 1ed. Pamplona: Cyted Sub-Programa X Química Farmacêutica, 2002. p.67-85.
- SMITH, D.K. Dendritic supermolecules – towards controllable nanomaterials. *Chemical communications* (Cambridge, England), v.7, p.34-44, 2006.

Referências Bibliográficas

- SNEJDARKOVA, M.; SVOBODOVA, L.; GAJDOS, V.; HIANIK, T. Glucose biosensors based on dendrimer monolayers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.12, p.1079-1082, 2001.
- SPOEL, D.V.D.; MAAREN, P.J.V.; CALEMAN, C. GROMACS molecule and liquid database. *Bioinformatics*, 2012.
- SZALAI, M.L.; McGRATH, D.V. Phototriggering of geometric dendrimer disassembly: an improved synthesis of 2,4-bis(hydroxymethyl)phenol based dendrimers *Tetrahedron*, v.60, p.7261-7266, 2004a.
- SZALAI, M.L.; McGRATH, D.V. Vinyl sulfoxide: a versatile trigger for dendrimer disassembly. *Polymer Preparation (American Chemical Society, Division Polymer Chemistry)*, v.45, p.110-111, 2004b.
- SZALAI, M. L.; KEVWITCH, R. M.; McGRATH, D. V. Dendrimer disassembly by benzyl ether depolymerization. *Journal of the American Chemical Society*, v.125, p.15688–15689, 2003.
- TAYLOR, J.B; TRIGGLE, D. J., Eds. *Comprehensive medicinal chemistry*. 8 vol.Oxford: Pergamon Press, 2007.
- TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50, p.1352-1364, 2006.
- TEIXEIRA, A.R.L.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. Evolution and pathology in Chagas disease - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, p.463-491, 2006.

Referências Bibliográficas

- TEMPONE, A.G.; SARTORELLI, P.; MADY, C.; FERNANDES, F. Natural products to anti-trypanosomal drugs: an overview of new drug prototypes for American trypanosomiasis. *Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, v.5, p.222-235, 2007.
- TESTA, B.; CALDWELL, J. Prodrugs revisited: the "ad hoc" approach as a complement to ligand design. *Medicinal Research Reviews*, v.16, p.233-241, 1996.
- TOKARSKI, J.S.; A. J. HOPFINGER, A.J. Constructing protein models for ligand-receptor binding thermodynamic simulations: An application to a set of peptidomimetic rennin inhibitors. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v.37, p.779-791, 1997.
- TOMALIA, D.A.; BAKER, H.; DEWALD, J.; HALL, M.; KALLOS, G.; MARTIN, S.; ROECK, J.; RYDER, J.; SMITH, P. A new class of polymers: starburst dendritic macromolecules. *Polymer Journal*, v.17, p.117-132, 1985.
- TOMALIA, D.A.; NAYLOR, A.M.; GODDARD, W.A. Starburst dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angewandte Chemie (International Edition in English)*, v.29, p.138-175, 1990.
- 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.
- UHRICH, K.; CANNIZZARO, S.; LANGER, R.; SHAKESHEFF, K. Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews*, v.99, p.3181–3198, 1999.

Referências Bibliográficas

- UMEZAWA, E.S.; STOLF, A.M.S.; CORBETT, C.E.P.; SHIKANAI-YASUDA, M.P. Chagas disease. *Lancet*, v.357, p.797-799, 2000.
- URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica*, v.115, p.55-68, 2010.
- URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*, v.19, p.495-501, 2003.
- VARGAS, F. *Síntese e aplicação de β -calcogeno amidas quirais em alquilações alílicas assimétricas*. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p.188, 2007. [Tese de Doutorado].
- VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; FRAIHA NETO, H. Considerations on the epidemiology of Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.94, p.395-398, 1999.
- ViewerLite 4.2, Accelrys Inc., 2001.
- VINHAES, M.C.; SCHOFIELD, C.J. Trypanosomiasis control: surmounting diminishing returns. *Trends in Parasitology*, v.19, p.112-113, 2003.
- VIODÈ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; CHAUVIÈRE, G.; BAKALARA, N.; PÉRIÉ, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochemical Pharmacology*, v.57, p.549-557, 1999.
- YANG, H.; KAO, W. J. Dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v.17, p.3-19, 2006.
- YANG, H.; LOPINA, S.T. *In vitro* enzymatic stability of dendritic peptides. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, v.76, p.398-407, 2006.

Referências Bibliográficas

- YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitology International*, v.57, p.105-109, 2008.
- WALKER, E.H.; PACOLD, M.E.; PERISIC, O.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P.T.; WVMANN, M.P.; WILLIAMS, R.L. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular Cell*, v.6, p.909-919, 2000.
- WELLS, M.; CROOKS, R.M. Interactions between organized, surface-confined monolayers and vapor-phase probe molecules. 10. Preparation and properties of chemically sensitive dendrimer surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, v.118, p.3988-3989, 1996.
- WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: JOLLE, G., WOOLDRIGE, K.R.M.(Eds.). *Drug Design: fact or fantasy?* London: Academic Press, 1984. p.47-72.
- WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursos. In:_____, Ed. *The practice of medicinal chemistry*. San Diego: Elsevier, 2008. p.721-742.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) *Strategic Direction for Research: Chagas Disease*, Geneva, 2002a.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) *Control of Chagas Disease. Tech.Rep. Ser.*, v.905, p.1-109, 2002b.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Fact sheet nº 340, Junho, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. Acesso em: 13 setembro 2011.

Referências Bibliográficas

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) *Control of the leishmaniases*, 2011.

WILLIAMSON, G.; BARRON, D.; SHIMOI, K.; TERAOKA, J. *In vitro* biological properties of flavonoid conjugates found *in vivo*. *Free Radical Research*, v.39, p.457-469, 2005.

WIWATTANAPATAPEE, R.; LOMLIM, L.; SARAMUNEE, K. Dendrimers conjugates for colonic delivery of 5-aminosalicylic acid. *Journal of Controlled Release*, v.88, p.1–9, 2003.

ZENG, F.; ZIMMERMAN, S.C. Rapid synthesis of dendrimers by an orthogonal coupling strategy. *Journal of the American Chemical Society*, v.118, p.5326-5327, 1996.

ZHUO, R.X.; DU, B.; LU, R.Z. *In vitro* release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer. *Journal of Controlled Release*, v.57, p.249-257, 1999.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, p.1051-1054, 2009.

ZUCCOTTO, F.; BRUN, R.; PACANOWSKA, D.G.; PEREZ, L.M.R.; GILBERT, I.H. The structure-based design and synthesis of selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v.9, p.1463-1468, 1999.

ANEXO I

ESPECTROS NO IV E DE RMN

Espectro 1 - Espectro no IV (ν , KBr, cm^{-1}) do NFOH.

IV (ν , KBr, cm^{-1})

3410 ($\nu_{\text{O-H}}$ álcool); 3335 ($\nu_{\text{N-H}}$ axial de amidas); 1674 ($\nu_{\text{C=O}}$ de amida); 1526 ($\nu_{\text{ass NO}_2}$ aromático); 1466 (δ_{CH_2} angular simétrica); 1361 ($\nu_{\text{sim NO}_2}$ aromático); 1328 (δ_{OH} angular); 1251 ($\delta_{\text{O-H}}$ axial de álcoois).

Espectro 2 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do NFOH. Solvente: DMSO-d_6 .

^1H -RMN (DMSO), 300 MHz, δ = ppm

2,50 (DMSO); 3,29 (H_2O); 4,61 (t, 2H_{11} , $J = 6$ Hz); 5,46 (t, 1H_{OH} , $J = 6$ Hz); 7,24 (d, 1H_3 , $J = 3$ Hz); 7,58 (t, 1H_{10} , $J = 3$ Hz); 7,78 (s, 1H_6); 7,81 (t, 1H_4 , $J = 6\text{Hz}$); 10,97 (s, 1H_8).

Espectro 3 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz) do NFOH. Solvente: DMSO- d_6 .

^{13}C -RMN (DMSO), 75 MHz, δ = ppm

39,32 (DMSO); 62,97 (C_8); 112,52 (C_4); 114,98 (C_3); 127,70 (C_6); 151,13 (C_2); 152,61 (C_5); 154,33 (C_7).

Espectro 4 - Espectro no IV (ν , KBr, cm^{-1}) do ácido málico protegido.

IV (ν , KBr, cm^{-1})

3270 (ν_{OH} livre de ácidos carboxílicos); 2940, 2897 (ν_{CH_2} simétrico e assimétrico); 1765 ($\nu_{\text{C=O}}$ de lactona); 1735 ($\nu_{\text{C=O}}$ de ácido carboxílico); 1386 (δ_{CH_3} angular assimétrica); 1344 (δ_{CH_3} angular simétrica); 1129 ($\delta_{\text{C-O-C}}$ axial de acetal).

Espectro 5 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do ácido málico protegido. Solvente: CDCl_3 .

RMN ^1H (CDCl_3), 300 MHz, δ = ppm

7,26 (CDCl_3); 1,55, 1,60 (s, $6\text{H}_4, \text{H}_5$); 2,81 (dd, 2H, H_2 , $J = 6$ Hz, $J = 6$ Hz); 3,00 (dd, 2H, H_2 , $J = 3$ Hz, $J = 3$ Hz); 4,70 (dd, 1H, H_3 , $J = 6$ Hz, $J = 3$ Hz); 10,30 (s, OH, 1H).

Espectro 6 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz) do ácido málico protegido. Solvente: DMSO- d_6 .

^{13}C -RMN (DMSO), 75 MHz, δ = ppm

39,34 (DMSO); 25,02 (C_7); 26,73 (C_6); 35,91 (C_5); 70,86 (C_2); 110,87 (C_3); 171,03 (C_4); 172,71 (C_1).

Estrutura provável do intermediário I

Espectro 7 - Espectro no IV (ν , KBr, cm^{-1}) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário I pelo método 1A.

Espectro 8 - RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário I pelo método 1A. Solvente utilizado: DMSO-d_6 .

Espectro 9: RMN ^{13}C (75 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário I pelo método 1A. Solvente utilizado: DMSO-d_6 .

Espectro 11 - RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediários I pelo método 1C. Solvente utilizado: DMSO- d_6 .

Espectro 12 –RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediários I pelo método 2A. Solvente utilizado: DMSO- d_6 .

Espectro 13 – RMN ^1H (300 MHz) do produto puro da reação de obtenção do intermediário I pelo método 2B. Solvente utilizado: CDCl_3

Espectro 18 – RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da da reação de obtenção do intermediário I pelo método 3E. Solvente utilizado: CDCl_3

Estrutura provável do intermediário II

Espectro 19: Espectro no IV (ν , KBr, cm^{-1}) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário II que utilizou o produto obtido em 1A como material de partida.

Espectro 20: RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário II, que utilizou o produto obtido em 1A como material de partida.

Solvente: CDCl_3 .

Espectro 21 – RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário II, que utilizou como material de partida o produto obtido em 1B. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Espectro 22 – RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário II, que utilizou como material de partida o produto obtido em 1C.

Solvente utilizado: DMSO-d₆

Espectro 23 –RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do intermediário II, que utilizou como material de partida o produto obtido em 2B. Solvente utilizado: CDCl_3 .

FIGURA 40– Espectros de RMN ^1H (300 MHz) dos produtos impuros das reações de obtenções dos intermediários II, que utilizaram como materiais de partida os produtos obtidos em: (1) 3A, espectro 24 e (2) 3B, espectro 25. Solvente utilizado: CDCl_3 .

FIGURA 41– Espectros de RMN ^1H (300 MHz) dos produtos impuros das reações de obtenções dos intermediários II, que utilizaram como materiais de partida o produto obtido em 3C. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Espectro 29 –RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário II, que utilizou como material de partida o produto obtido em 3E. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Estrutura provável do dendrímero I

Espectro 31: Espectro no IV (ν , KBr, cm^{-1}) do produto impuro da reação para obtenção do dendrímero de 3-hidroxi flavona obtido na metodologia 4A.

FIGURA 43 – RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do dendrímero de primeira geração contendo 3-hidroxiavona obtido pelo método 5B. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Espectro 37—RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do dendrímero de primeira geração contendo 3-hidroxiavona pelo método 6B. Solvente utilizado: CDCl_3 .

FIGURA 44– Espectros de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do dendrímero de primeira geração contendo 3-hidroxiflavona pelo método 7. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Estrutura provável do intermediário III

Espectro 41: Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção intermediário III pelo método 8A. Solvente utilizado: DMSO-d_6 .

(1) Espectro 42

(2) Espectro 43

Figura 45: Espectros de RMN ^1H (300 MHz) dos produtos impuros das reações de obtenções dos intermediários III pelos métodos: (1) método 8B, espectro 42 e (2) método 8C, espectro 43. Solvente utilizado: DMSO- d_6 .

Espectro 44: Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário III pelo método 9. Solvente utilizado: DMSO-d_6 .

Estrutura provável do intermediário IV

Figura 46- Espectros de RMN ^1H (300 MHz) dos produtos impuros das reações de obtenções dos intermediários IV, que utilizaram como materiais de partida os intermediários III obtido em: (1) 8B, espectro 45; (2) 8C, espectro 46. Solvente utilizado: DMSO- d_6 .

Espectro 47: Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário IV, que utilizou como material de partida o intermediário III obtido em 9. Solvente utilizado: DMSO- d_6 .

Estrutura provável do dendrímero III

Espectro 48: Espectros de RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção dos dendrímeros de primeira geração com quercetina pelo método 10.

Solvente utilizado: DMSO-d_6 .

Espectro 49: Esp RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do dendrímeros de primeira geração com quercetina pelo método 11. Solvente utilizado: DMSO- d_6 .

Estrutura provável do intermediário V

Espectro 50 - IV (ν , KBr, cm^{-1}) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário V pelo método 12A.

Espectro 51 - RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário V pelo método 12A. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Espectro 52: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário V pelo método 12A. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Espectro 53

Espectro 54

FIGURA 47 - Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário V pelo método 12B. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Espectro 55

Espectro 56

FIGURA 48 - Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário V pelo método 12C. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Espectro 57 - RMN de ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário V pelo método 12D. Solvente utilizado: DMSO-d_6 .

Espectro 58 – RMN ¹H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário V pelo método 13A. Solvente utilizado: CDCl₃.

Espectro 59 - RMN ¹³C (75 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário V pelo método 13A. Solvente utilizado: CDCl₃.

(1) Espectro 60

(2) Espectro 61

FIGURA 49: RMN de ^1H (300 MHz) dos produtos impuros da reação do intermediário V pelos métodos: (1) 13B, espectro 60 (2) 13C, espectro 61. Solvente utilizado: CDCl_3 .

FIGURA 50: Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) dos produtos impuros das reações de obtenções dos intermediários V pelos métodos: (1) 14A, espectro 62 e (2) 14B, espectro 63. Solvente utilizado: DMSO-d_6 .

Espectro 64 - RMN de ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário V pelo método 14C e extração com água e soluções saturadas de NaHCO_3 e NaCl . Solvente utilizado: CDCl_3 .

Estrutura provável do intermediário VI

Espectro 65 - RMN de ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário VI, que teve como material de partida o intermediário V obtido em 12A.

Solvente utilizado: DMSO-d_6 .

Espectro 66 - RMN de ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do intermediário VI, que teve como material de partida o intermediário V obtido em 12C.

Solvente utilizado: DMSO- d_6 .

Espectro 67 - RMN ^1H (300 MHz) do intermediário VI impuro obtido a partir do método 12D. Solvente utilizado: DMSO- d_6 .

FIGURA 51 - Espectros de RMN ^1H (300 MHz) e de ^{13}C (75 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do dendrímero de primeira geração com 3-hidroxiavona pelo método 16A. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Espectro 70 - IV do produto impuro da reação de obtenção do dendrímero de primeira geração com 3-hidroxiavona obtido pelo método 16B.

FIGURA 52 - Espectros de RMN ^1H (300 MHz) e de RMN ^{13}C (75 MHz) do produto impuro da reação de obtenção do dendrímero de primeira geração de 3-hidroxiavona pelo método 16B. Solvente utilizado: DMSO-d_6 .

Estrutura provável do dendrímero V

Espectro 73 - RMN ¹H (300 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do dendrímero de primeira geração de NFOH pelo método 17. Solvente utilizado: DMSO-d₆.

Estrutura provável do dendrímero I

Espectro 74: Espectro de RMN ¹H (300 MHz) do produto isolado a partir de 4B em cromatografia preparativa. Solvente utilizado: DMSO-d₆.

Estrutura provável do dendrímero III

Espectro 75 - RMN ¹H (300 MHz) do produto isolado a partir de 10A em cromatografia preparativa, fase móvel acetato de etila/tolueno 1:2, v/v. Solvente utilizado no RMN: DMSO-d₆.

Espectro 76 - RMN ^1H (300 MHz) do produto isolado a partir de 10A em cromatografia preparativa, fase móvel acetato de etila/hexano 90:10, v/v. Solvente utilizado no RMN: DMSO- d_6 .

Espectro 77 - RMN ^1H (300 MHz) do produto isolado a partir de 10A por recristalização em metanol. Solvente utilizado no RMN: DMSO- d_6 .

FIGURA 53: Espectros de RMN (1) ^1H (300 MHz) (1) e (2) RMN ^{13}C (75 MHz) do produto isolado por CLAE. Solvente utilizado: DMSO- d_6 .

Estrutura provável do intermediário V

FIGURA 55 - Espectros de RMN de ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) do produto da reação de obtenção do intermediário V pelo método 12B isolado da coluna cromatográfica. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Estrutura provável do intermediário VI

Espectro 84 - RMN ^1H (300 MHz) do intermediário VI isolado da coluna cromatográfica. Solvente utilizado: DMSO- d_6 .

ANEXO II

DOUTORADO SANDUÍCHE

Orientador: Prof. Antony D'Emanuele
Departamento de Farmácia
University of Central Lancashire
Preston - Inglaterra

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O flavonóide 3-hidroxiavona apresentou boa atividade *in vitro* para doença de Chagas e leishmaniose, porém mostrou-se inativo *in vivo*, quando comparado com miltefosina, padrão de ensaio leishmanicida (TASDEMIR *et al.*, 2006). Portanto, os dendrímeros podem ser úteis para melhorar as propriedades físico-químicas deste derivado polifenólico, a fim de promover seu uso na terapêutica.

O principal objetivo do doutorado sanduíche foi realizar estudo de liberação de pró-fármacos dendriméricos. As moléculas, estruturalmente compostas por ácido succínico e/ou ácido L-málico (espaçantes), 3-hidroxiavona (composto ativo), e PAMAM (geração 1) (Figura 1), foram utilizadas como modelo para os dendrímeros propostos na tese de Doutorado.

Figura 1: Representação esquemática dos pró-fármacos dendriméricos com os respectivos espaçantes: (1) ácido succínico e (2) ácido L-málico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

- Acetato de etila
- Ácido clorídrico (HCl)
- Ácido trifluoracético (TFA)
- Álcool metílico
- Anidrido succínico
- Éter etílico
- Diclorometano
- *N,N'*- Dicicloexilcarbodiimida (DCC)
- 4-Dimetilaminopiridina (DMAP)
- Dimetilformamida (DMF)
- Hexano
- Hidróxido de sódio (NaOH)
- 3-Hidroxiflavona
- *N*-Hidroxissuccinimida (NHS)
- Poliamidoamina (PAMAM) (geração 1)
- Piridina
- Solução tampão fosfato (PBS)
- Sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄)
- Tetraidrofurano (THF)

2.2 EQUIPAMENTOS

- Banho maria com agitação GRANT OLS 200
- Centrífuga JOUAN B4
- Centrífuga de eppendorf SANYO
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advanced DPX-300
- HPLC Agilent Technologies 1200, coluna Luna 5 µm, C18 (250 mm × 4.6 mm, Phenomenex)

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Síntese

2.3.1.1 Síntese do intermediário 1 (NAJLAH *et al.*, 2007b)

As condições de reação para obtenção do intermediário 1 podem ser observadas na Tabela I.

Esquema 1: Síntese do intermediário 1.

Tabela I: Condições de reação para obtenção do intermediário 1

Método	Quantidade de reagentes	Tempo de reação	Temperatura	Extração
A	-3-hidroxi flavona (1 mmol)	50 horas	25 horas TA*	Éter etílico e água
	-anidrido succínico (2 mmol)		25 horas 30 °C	
	-DMAP (0,1 mmol)			
	-piridina (0,8 mL)			
B	-3-hidroxi flavona (1 mmol)	5 dias	30 °C	Éter etílico e água
	-anidrido succínico (2 mmol)			
	-DMAP (0,1 mmol)			
	-piridina (0,8 mL)			
C	-3-hidroxi flavona (1 mmol)	5 dias	TA	Éter etílico e água
	-anidrido succínico (2 mmol)			
	-DMAP (0,1 mmol)			
	-piridina (0,8 mL)			
D	-3-hidroxi flavona (1 mmol)	5 dias	30 °C	Éter etílico e água
	-anidrido succínico (2 mmol)			
	-DMAP (0,1 mmol)			
	-piridina (0,8 mL)			
E	-3-hidroxi flavona (1 mmol)	24 horas	TA	Hexano
	-anidrido succínico (2 mmol)			
	-DMAP (0,1 mmol)			
	-piridina (0,8 mL)			
F	-3-hidroxi flavona (1 mmol)	24 horas	TA	Hexano
	-anidrido succínico (2 mmol)			
	-DMAP (0,1 mmol)			
	-piridina (0,8 mL)			
G	-3-hidroxi flavona (2 mmol)	24 horas	TA	Hexano
	-anidrido succínico (4 mmol)			
	-DMAP (0,2 mmol)			
	-piridina (1,6 mL)			

*TA = temperatura ambiente

Método geral de síntese

Adicionou-se 3-hidroxi flavona a solução de anidrido succínico com DMAP, em THF. Piridina seca foi colocada e a solução foi mantida sob agitação. THF foi removido sob pressão reduzida e realizou-se a extração. As condições de reação estão descritas na Tabela I. Os produtos obtidos nos métodos A e F foram purificados em coluna cromatográfica com fase móvel hexano/acetato de etila (gradiente de concentração).

As reações foram monitoradas com Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando hexano/acetato de etila (1:2, v/v) como fase móvel.

2.3.1.2 Ativação do ácido carboxílico (NAJLAH *et al.*, 2007b)

Esquema 2: Ativação do éster.

À solução do composto obtido no método E (0,35 mmol) em THF, adicionou-se DCC (0,45 mmol). A mistura foi mantida sob agitação por 1 hora. Em seguida, NHS (0,45 mmol) foi colocado e o sistema ficou sob agitação por 24 horas. A mistura reacional foi filtrada e realizou-se extração com água (2 x 10 mL), solução aquosa de HCl 0,1 M (2 x 10 mL), solução aquosa de NaOH 0,1 M (2 x 10 mL), água (2 x 10 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente rotaevaporado.

2.3.1.3 Síntese do pró-fármaco dendrimérico (NAJLAH *et al.*, 2007b)

As condições de reação para obtenção do pró-fármaco dendrimérico podem ser observadas na Tabela II.

Esquema 3: Síntese do pró-fármaco dendrimérico.

Tabela II: Condições para obtenção do pró-fármaco dendrimérico

Método	Temperatura	DMF (mL)	Fases móveis utilizada na Cromatografia de Exclusão de Tamanho (v/v)
A	Temperatura ambiente	20 mL	Água/álcool metílico (1:4)
B	30 °C	5 mL	Álcool metílico

Adicionou-se DCC (0,45 mmol) à solução do intermediário de 3-hidroxiflavona e ácido L-málico (0,35 mmol) em THF. O sistema foi mantido sob agitação por 1 hora e, em seguida, juntou-se NHS (0,45 mmol). Manteve-se a agitação por mais 24 horas. A mistura reacional foi filtrada e realizou-se a extração com água (2 x 10 mL), solução aquosa de HCl 0,1 M (2 x 10 mL), solução aquosa de NaOH 0,1 M (2 x 10 mL), água (2 x 10 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada, o solvente rotaevaporado e dissolvido em DMF. As condições das reações estão descritas na Tabela II. A solução foi adicionada lentamente em DMF contendo PAMAM (geração 1) (0,3 mmol) e o sistema foi matido sob agitação por 5 dias. Os produtos foram purificados utilizando Sephadex

15. Com o produto obtido no método A, antes da purificação em coluna, realizou-se diálise por 1 dia.

2.3.2 Estudos de liberação enzimática (NAJLAH *et al.*, 2007a)

2.3.2.1 Hidrólise dos pró-fármacos dendriméricos em homogenato fígado de rato

Fígado de rato macho Sprague-Dawley foi seco com papel absorvente e a massa foi medida. Posteriormente, cortou-se o material em pequenos pedaços e adicionou-se solução tampão fosfato gelada (pH 7,4), na proporção de 1 g de tecido para 1 mL de tampão. O homogeneizado de fígado foi centrifugado a 9000 rpm por 45 min. O sobrenadante foi utilizado nos estudos de hidrólise. A reação iniciou com adição de quantidade adequada de pró-fármaco dendrimérico a 2 mL do sobrenadante pré-aquecido para gerar concentração final de 2×10^{-4} M. A solução foi mantida a 37 °C. Em intervalos de tempos apropriados, amostras (50 µL) foram retiradas e adicionaram-se 200 µL de solução metanólica de salicilato de sódio (1,25 mM) para desproteínizar a amostra e parar a reação. Após centrifugação imediata por 5 min em 9000 rpm, o sobrenadante foi armazenado em -20 °C até que fossem feitas as análises em HPLC, com fase móvel álcool metílico/água/ácido trifluoracético (80:20:0,1, v/v/v). O fluxo foi de 1 mL/minuto e o comprimento de onda em UV $\lambda = 240\text{-}310$ nm.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SÍNTESE

3.1.1 Síntese do intermediário 1

As tentativas de obtenção do intermediário 1 podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2: Representação esquemática das metodologias desenvolvidas na tentativa de obtenção do intermediário 1.

Após 50 horas de reação, a CCD do produto obtido no método A mostrou duas manchas. Uma delas com o valor R_f igual ao da 3-hidroxiflavona (0,75) e a outra, com $R_f = 0,21$. Assim, a realizou-se cromatografia em coluna e o resultado pode ser observado no espectro de RMN ^1H (espectro 1). Excessos de sinais confirmaram o que a purificação não foi adequada .

Espectro 1 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do intermediário 1 obtido no método A.
Solvente: DMSO- d_6 .

As diferenças entre os métodos B, C e D foram temperatura e tempo de reação. O objetivo das modificações foi avaliar a importância destes fatores na síntese do produto. No final dos experimentos, a CCD mostrou apenas uma mancha, relacionada com a 3-hidroxiflavona.

A extração do composto obtido no método E foi realizada com hexano, ao invés de éter etílico e água, utilizados nos métodos A, B, C e D. A CCD mostrou duas manchas. Uma delas (hexano/acetato de etila 1:2, v/v) com o mesmo valor da 3-hidroxiflavona R_f (0,75) e a outra com $R_f = 0,68$. No espectro de RMN ^1H (espectro 2) observam-se sinais que poderiam caracterizar o composto, especialmente nas regiões de 2,42 ppm (grupo metileno do ácido succínico) e entre 7,5-8 ppm, referentes ao composto ativo.

Espectro 2 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do intermediário 1 obtido no método E.
Solvente: DMSO- d_6 .

O DCC é amplamente utilizado como agente condensante de carboxi-grupos (CHOWDHRY *et al.*, 2011). O DCU (*N, N'*-dícicloexiluréia) é o subproduto insolúvel principal formado com o uso de DCC. O mecanismo de formação da DCU, com a utilização de DCC e NHS, pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 – Mecanismo de formação do subproduto DCU utilizando o agente condensante DCC e NHS (NAJLAH *et al.*, 2006).

Apenas para um teste, já que o produto obtido no método E mostrou uma mancha em CCD diferente da 3-hidroxi-flavona, a ativação do ácido carboxílico com DCC e NHS foi realizada. Formou-se DCU após 24 horas de reação. Portanto, possivelmente, o composto continha a função ácido carboxílico.

Como, provavelmente, o intermediário 1 foi obtido no método E, principalmente pela formação do DCU com a ativação com DCC e NHS, o objetivo do método F foi

sintetizar esse intermediário e purificá-lo. Uma vez puro, caracterizá-lo. O espectro de RMN ^1H (espectro 3) do composto obtido após cromatografia em coluna mostrou que a purificação não foi adequada. Não existem sinais do ácido succínico.

Espectro 3 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do intermediário 1 obtido no método F.
Solvente: DMSO- d_6 .

O objetivo do método G foi avaliar o comportamento da reação com o aumento da concentração dos reagentes. A CCD apresentou duas manchas, como observado nos procedimentos de E e F. Para este produto, a análise em IV mostrou uma banda discreta, que poderia estar relacionada com o estiramento carbonila de éster (1725 cm^{-1}) (Figura 4 - Espectro de 5). Essa banda não foi observada no espectro em IV da 3-hidroxiavona (Figura 4 - Espectro 4).

Figure 4 – Espectros no IV (ν , cm^{-1}) da 3-hidroxi flavona e do produto obtido no método G.

Como o período do doutorado sanduíche foi de apenas 4 meses, infelizmente não houve tempo suficiente para novas tentativas de síntese do intermediário 1.

3.1.2 Síntese do pró-fármaco dendrimérico

Com o intermediário 3-hidroxi flavona e ácido L-málico málico, dois métodos foram realizados na tentativa de obtenção do pró-fármaco dendrimérico. No método

A, 20 mL de DMF foram utilizados na solubilização do intermediário. O ponto de ebulição do DMF é 153 °C (SANTOS, MARZÁN, 2002), portanto, é difícil a remoção do solvente, mesmo em pressão reduzida. Assim, realizou-se diálise, antes da cromatografia em coluna, com o objetivo de eliminar o DMF. No espectro de RMN ¹H de número 6 (Figura 5) e, principalmente, no expandido (espectro 7 - Figura 5) existem sinais nas regiões 2-3,5 e 5 ppm (PAMAM) e entre 7-8 ppm (composto ativo), que podem ser do produto desejado. No entanto, a relação de hidrogênios entre a 3-hidroxiflavona e o dendrímero foi menor que 1, indicando o que a reação não foi bem-sucedida.

Espectro 6 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do produto obtido no método A. Solvente: MeOD- d_4 .

Espectro 7 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do produto obtido no método A. Solvente: MeOD- d_4 . (Expandido)

Figura 5 – Espectros de RMN ^1H (300 MHz) do produto obtido no método A e o mesmo espectro expandido.

No método B, a cromatografia em coluna foi realizada com álcool metílico. No espectro de RMN ^1H (espectro 8 - Figura 6) existem sinais que podem caracterizar o composto, especialmente nas regiões 2-3 e 5 ppm (PAMAM) e entre 7-8 ppm (3-hidroxiavona). No entanto, os sinais verificados na região entre 1 e 2 ppm podem ser de DCU. Assim, uma nova cromatografia em coluna foi realizada na tentativa de remover DCU. O espectro 9 (Figura 6) (RMN de ^1H) mostra o resultado. A manutenção de sinais na região entre 1-2 ppm comprovou que a purificação não foi adequada.

Figura 6 – Espectros de RMN ^1H (300 MHz) do produto obtido no método B.

Na tentativa de remover DCU, diálise foi realizada com metade do produto obtido no método B, após a segunda cromatografia em coluna. O espectro de RMN de ^1H (espectro 10) mostra que o procedimento não deu certo. Nenhum sinal de 3-hidroxi flavona foi observado. Provavelmente, o tamanho dos poros da membrana não foi adequado para evitar a saída do produto para a água.

Espectro 10 - Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do produto obtido no método B após a membrana de diálise. Solvente: MeOD- d_4 .

3.2 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO ENZIMÁTICA

3.2.1 Curva de calibração

Duas fases móveis para HPLC foram testadas na tentativa de se obter um método analítico para a 3-hidroxi flavona: (1) álcool metílico/água/TFA (70:30:0,1, v/v/v). Nesta, o tempo de retenção foi de 10,975 minutos e (2) álcool metílico/água/TFA (80:20:0,1, v/v/v). O tempo de retenção foi de 6,072 minutos. Devido ao menor tempo de retenção, a segunda condição foi a escolhida para realizar curva de calibração, bem como o estudo de hidrólise enzimática. A Figura 7 mostra os cromatogramas.

Figura 7 – Cromatogramas da 3-hidroxi flavona nas respectivas fases móveis: (1) álcool metílico/água/TFA (70:30:0,1, v/v/v) e (2) álcool metílico/água/TFA (80:20:0,1, v/v/v).

A curva de calibração foi construída considerando a concentração do composto ativo (eixo x) e a área do sinal correspondente observado em HPLC (eixo y). A Tabela III e Gráfico 1 mostram estes resultados.

Tabela III: Concentração de 3-hidroxi flavona e correspondente área do sinal

Concentração (mg/mL)	Área (mAU*s)
0,01	62,59
0,03	169,93
0,1	668,68
0,2	1499,88
0,5	4100,54

Gráfico 1: Curva de calibração da 3-hidroxi flavona.

A validação da linearidade da curva de calibração é representada pelo coeficiente de correlação (R^2). Curvas com $r \geq 0,995$ são consideradas lineares (LOCO *et al.*, 2002). Assim, o valor de R^2 (0,9985) observado no Gráfico 1 demonstrou a linearidade da curva de calibração.

3.2.2 Hidrólise dos pró-fármacos dendriméricos em homogenato de fígado de rato

Embora o espectro de RMN de ^1H do PAMAM conjugado com a 3-hidroxi flavona (produto obtido no método B) tivesse apresentado contaminação com DCU, este composto foi utilizado no desenvolvimento do estudo enzimático. O período de 4 meses não foi suficiente para se repetir a purificação e, portanto, o produto foi utilizado mesmo impuro, pois o principal objetivo do estágio sanduíche era aprender a técnica de hidrólise de pró-fármaco.

Trinta amostras foram coletadas durante o experimento em: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390, 420, 450, 480, 1320, 1380 and 1440 minutos.

A CLAE do pró-fármaco dendrimérico (cromatograma 3, Figura 8) apresentou dois sinais principais. O primeiro, em 1,603 minutos, provavelmente relacionado com o composto desejado. O segundo, em 5,950 minutos, pode ser de DCU, já que existiam evidências de sua presença no espectro de RMN de ^1H (espectro 9, página

261). É interessante mencionar que este sinal não foi observado nos cromatogramas resultantes dos estudos de hidrólise (cromatogramas 4-11, Figura 8). Uma possível explicação para este comportamento seria a condição de ensaio. O experimento foi realizado em tampão fosfato (pH 7,4) e o sobrenadante foi utilizado na análise de CLAE. DCU não é solúvel em tampão e, provavelmente, pode ter precipitado em solução. Dessa maneira, não foram observados os sinais na região próxima de 6 minutos.

Figura 8 - Cromatograma 3 do pró-fármaco dendrimérico.

Os cromatogramas do estudo de hidrólise estão representados na Figura 9. Após 24 horas de experimento, não houve liberação de 3-hidroxi-flavona do dendrímero. O ácido L-málico, utilizado como espaçante, tem apenas quatro carbonos. Provavelmente, o tamanho desta cadeia carbônica não foi suficiente para evitar impedimento estérico sobre a carbonila foco deste trabalho. Compostos com espaçantes maiores facilitam a aproximação enzimática. Existem estudos na literatura que comparam o número de carbonos de uma cadeia e a eficiência na hidrólise da ligação éster. Conjugados em que o composto ativo foi ligado ao dendrímero com espaçantes maiores apresentaram os melhores resultados de clivagem (NAJLAH *et al.*, 2006; NAJLAH *et al.*, 2007a)

Cromatograma 4: 0 minuto

Cromatograma 5: 60 minutos

Cromatograma 6: 120 minutos

Cromatograma 7: 160 minutos

Figura 9 – Cromatogramas resultantes dos estudos de hidrólise enzimática em 0, 60, 120, 160, 360, 480, 1320, 1440 minutos.

Figura 9 – Cromatogramas resultantes dos estudos de hidrólise enzimática em 0, 60, 120, 160, 360, 480, 1320, 1440 minutos (cont).

4 CONCLUSÕES

- ✓ Embora oito métodos tenham sido realizados, a síntese do intermediário 1 não foi bem-sucedida;

- ✓ Dois métodos diferentes foram desenvolvidos na tentativa de se obter o pró-fármaco dendrimérico. O primeiro deles não deu certo e a relação entre os hidrogênios, no espectro de RMN de ^1H , entre o composto ativo e PAMAM foi menor que 1. Portanto, a 3-hidroxiflavona não foi ligada de modo eficiente no dendrímero. Evidências sugerem que o segundo método foi realizado com sucesso. Apesar do espectro de RMN de ^1H apresentar sinais que poderiam estar relacionados com o subproduto DCU, este composto foi utilizado no estudo de hidrólise;
- ✓ O estudo de hidrólise mostrou que a 3-hidroxiflavona não foi liberada do dendrímero nas condições de ensaio. Provavelmente, o impedimento estérico sobre a carbonila dificultou a aproximação enzimática e, consequentemente, a clivagem do éster;
- ✓ Estes resultados foram muito importantes para o planejamento de um novo pró-fármaco dendrimérico de 3-hidroxiflavona. Espaçantes com mais de 4 átomos de carbono poderão ser testados com vistas a permitir a ação enzimática.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHOWDHRY, B.Z.; DINES, T.J.; LEHARNE, S.A.; RYALL, J.P.; SHADIA, I.T.; WITHNALL, R. Vibrational spectroscopy and DFT calculations of *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide. *Journal of Raman Spectroscopy*, v.42, p.230-238, 2011.
- LOCO, J.V.; ELSKENS, M.; CROUX, C.; BEERNAERT, H. Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance*, v.7, p.281-285, 2002.
- NAJLAH, M.; FREEMAN, S.; ATTWOOD, D.; D' EMANUELE, A. Synthesis, characterization and stability of dendrimer prodrugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v.308, p.175-182, 2006.

NAJLAH, M.; FREEMAN, S.; ATTWOOD, D.; D'EMANUELE, A. *In vitro* evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v.336, p.183-190, 2007a.

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, 2007b.

SANTOS, I.P.; MARZÁN, L.M.L.; Synthesis of silver nanoprisms in DMF. *Nano Letters*, v.2, p.903-905, 2002.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50, p.1352-1364, 2006.

ANEXO III

BUSCA DE NOVOS FOCOS CENTRAIS
PARA SÍNTESE DE NOVOS DENDRÍMEROS

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Face às dificuldades sintéticas encontradas na utilização de inositol como foco central, resolveu-se empregar outros centros, como a etilenodiamina, o etilenoglicol e o glicerol (Figura 1).

FIGURA 1: Estruturas: (1) etilenodiamina, (2) etilenoglicol e (3) glicerol.

Etilenodiamina, etilenoglicol e glicerol são utilizados na indústria farmacêutica para a síntese de fármacos (MORRISON, 1994; TOMALIA *et al.*, 1985; ARRUDA, RODRIGUES, FELIPE, 2007). A etilenodiamina, mais especificamente, é o foco central do PAMAM (dendrímero de poliamidoamina) (TOMALIA *et al.*, 1985).

O principal objetivo deste trabalho foi a busca de novos focos centrais para síntese de novos dendrímeros dos compostos bioativos empregados na tese. Estes compostos são polifuncionais, permitindo o crescimento exponencial dos dendrímeros. Porém, por apresentarem menor número de grupos funcionais (dois para etilenodiamina e etilenoglicol, e três hidroxilas para o glicerol), quando comparados ao inositol (seis hidroxilas), possibilitam maior controle sobre a síntese e número maior de substituições no centro.

Para a etilenodiamina, a amida formada pela amina da etilenodiamina e o ácido carboxílico de ácido málico protegido é mais estável à hidrólise do que a ligação éster, permitindo maior controle sobre a liberação. Ademais, direciona a clivagem para as ramificações que são constituídas por ésteres formados entre o ácido málico e o composto ativo (D'EMANUELE, ATTWOOD, 2005).

As estruturas dos dendrímeros de terceira geração com os focos centrais: etilenodiamina, etilenoglicol e glicerol, sem substância ativa, podem ser observadas na Figura 2.

FIGURA 2: Estrutura dos dendrímeros de terceira geração, sem substância ativa, planejados com os novos focos centrais: (A) etilenodiamina, (B) etilenoglicol e (C) glicerol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Reagentes e solventes

- ✓ 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC)
- ✓ 4-Dimetilaminopiridina (DMAP)
- ✓ Acetato de etila
- ✓ Ácido clorídrico
- ✓ Cloreto de sódio
- ✓ Cloroformato de etila
- ✓ Clorofórmio
- ✓ Etilenodiamina
- ✓ Etilenoglicol
- ✓ Glicerol
- ✓ Hexano
- ✓ Hidróxido de sódio
- ✓ Metanol
- ✓ *N*-Metilmorfolina
- ✓ Sulfato de sódio anidro
- ✓ Tetraidrofurano (THF)

2.1.2 Equipamentos

- ✓ espectrofotômetro FTIR Bomem MB100;
- ✓ espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker 300 MHz, modelo Advanced DPX-300
- ✓ rotaevaporador Büchi

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Síntese dos intermediários 1A, 1B e 1C (ácido málico protegido com etilenodiamina, etilenoglicol e glicerol, respectivamente)

Esquema I: Reações de obtenção dos intermediários 1A, 1B e 1C pelos métodos A e B.

2.2.1.1 Método A (adaptado de GOLDBERG, GHANDEHARI, SWAAN, 2010; GIAROLLA, 2007)

Em balão acoplado a condensador de refluxo e banho de gelo, mantiveram-se sob agitação em 30 mL de THF, EDC ($6,27 \times 10^{-3}$ mol) e ácido málico protegido ($5,75 \times 10^{-3}$ mol). Após 30 minutos, o banho de gelo foi retirado, elevou-se a temperatura a 50 °C e adicionaram-se a etilenodiamina ($2,85 \times 10^{-3}$ mol), etilenoglicol ($2,85 \times 10^{-3}$ mol) ou glicol ($1,90 \times 10^{-3}$) e DMAP ($2,85 \times 10^{-3}$ mol). A mistura reacional foi mantida sob agitação por 24 horas. Posteriormente, adicionaram-se, ao meio reacional, 50 mL de acetato de etila e o material foi extraído em sistema água e acetato de etila. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 50 °C, obtendo-se o respectivo intermediário I (Figura A.11).

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada, com fase móvel clorofórmio/metanol 2:1 (v/v).

2.2.1.2 Método B (adaptado de VARGAS, 2007)

Os reagentes e respectivos números de mol utilizados no método B podem ser observados na Tabela I.

Tabela I: Reagentes e número de mol utilizado no método B

Foco central	Reagentes	Número de mols
Etilenodiamina	Ácido málico protegido	$5,75 \times 10^{-3}$
	Cloroformato de etila	$1,25 \times 10^{-2}$
	etilenodiamina	$2,85 \times 10^{-3}$
	<i>N</i> -metilmorfolina	$1,25 \times 10^{-2}$
Etilenoglicol	Ácido málico protegido	$5,75 \times 10^{-3}$
	Cloroformato de etila	$1,25 \times 10^{-2}$
	Etilenoglicol	$2,85 \times 10^{-3}$
	<i>N</i> -metilmorfolina	$1,25 \times 10^{-2}$
Glicerol	Ácido málico protegido	$5,75 \times 10^{-3}$
	Cloroformato de etila	$1,80 \times 10^{-2}$
	Glicerol	$1,90 \times 10^{-3}$
	<i>N</i> -metilmorfolina	$1,80 \times 10^{-2}$

Em banho de gelo, adicionou-se a solução de *N*-metilmorfolina em 3 mL de THF à solução de ácido málico protegido dissolvido em 3 mL de THF. Agitou-se por 15 minutos, adicionando-se, então, o cloroformato de etila solubilizado em 3 mL de THF. Manteve-se a agitação por mais 30 minutos e adicionou-se a solução de álcool ou amina em 3 mL de clorofórmio. O número de mol utilizado para cada reagente pode ser observado na Tabela I. A reação foi mantida sob agitação e banho de gelo por mais 1 hora. Posteriormente, o meio reacional foi mantido sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Ao término da reação, diluiu-se a mistura reacional com 50 mL de acetato de etila e lavou-se, subsequentemente, com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M (duas vezes com 15 mL), solução saturada de cloreto de sódio (15 mL), solução saturada de ácido clorídrico 1 M (duas vezes com 15 mL) e, novamente, com solução saturada de cloreto de sódio (15 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de

sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 50 °C, obtendo-se o respectivo intermediário I.

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada, com fase móvel hexano/acetato de etila 2:1 (v/v).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE DOS INTERMEDIÁRIOS 1A, 1B E 1C (ÁCIDO MÁLICO PROTEGIDO COM ETILENODIAMINA, ETILENOGLICOL E GLICEROL, RESPECTIVAMENTE)

4.1.1 Método A

✓ Etilenodiamina

Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada mostrou a formação de mancha com R_f de 0,62, diferente dos valores encontrados para os materiais de partida, etilenodiamina e ácido málico protegido, que apresentam os valores R_f de 0,12 e 0,57, respectivamente. O espectro de RMN ^1H (Espectro 1) mostra indícios da obtenção do produto desejado, pois existem sinais correspondentes aos hidrogênios das metilas presentes no ácido málico protegido em 1,67 e 1,72 ppm. Além disso, existem sinais em 2,90 e 4,46 ppm, que caracterizam o espaçante. Os sinais em 3,41 e 7,84 ppm sugerem, respectivamente, a presença dos hidrogênios dos carbonos e do nitrogênio da etilenodiamina.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 2) mostrou sinais em 25,24 e 25,49, 26,25 e 26,71 ppm, relativos aos carbonos das metilas presentes na lactona do ácido málico protegido. Ainda com relação ao espaçante, observam-se sinais em 35,06 e 36,12, 70,24 e 70,53, 110,24 e 110,46 ppm, referentes aos carbonos 5, 2 e 3 do ácido málico protegido, respectivamente. Os sinais entre 170,28 e 172,21 ppm são indicativos de carbonos carbonílicos do ácido málico protegido

e da função amida formada. Com relação à etilenodiamina, apareceram sinais em 44 ppm, provavelmente relativos aos carbonos metilênicos da etilenodiamina. Estes resultados indicam a provável obtenção do intermediário IA com duas substituições. No entanto, há sinais adicionais que mostram impurezas, provavelmente EDU (1-(3-diaminopropiluréia), no composto obtido, evidenciando a necessidade de purificação do mesmo.

Espectro 1: Espectro de RMN ¹H (300 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do intermediário IA pelo método A. Solvente utilizado: CDCl₃.

Espectro 2: Espectro de RMN ¹³C (75 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do intermediário 1A pelo método A. Solvente utilizado: CDCl₃.

✓ Etilenoglicol

O intermediário IB é formado pela reação de esterificação entre o álcool e o ácido carboxílico de etilenoglicol e ácido málico protegido, respectivamente. Na cromatografia em camada delgada, observou-se mancha com *R_f* de 0,69, valor diferente dos materiais de partida, etilenoglicol e ácido málico protegido, de *R_f* 0,35 e 0,57, respectivamente. No espectro de RMN ¹H (Espectro 3) apareceram sinais em 1,60 e 1,62 ppm, indicativos de hidrogênios dos carbonos 6 e 7 do ácido málico protegido. Em adição, observam-se os sinais próximos a 2,50 e

2,60 ppm, relativos aos hidrogênios do C2 do ácido málico protegido. Os sinais próximos de 4,30 ppm indicam hidrogênios do etilenoglicol.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 4) mostrou sinais em 25,18 e 25,34, 26,13 e 26,58 ppm, que caracterizam carbonos metílicos do ácido. Os sinais próximos de 35, 70 e 110 ppm podem ser referentes aos carbonos 5, 2 e 3 do ácido málico protegido, respectivamente. Em adição, os sinais na região entre 170-172 ppm indicam as carbonilas do ácido málico protegido e do éster formado. Os sinais relativos aos carbonos do etilenoglicol apareceram próximos de 62 ppm. Portanto, estes resultados sugerem que se obteve o intermediário IB com duas substituições. Como no caso anterior, o composto obtido mostrou impurezas, que demandam a purificação do mesmo.

Espectro 3: Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do intermediário 1B pelo método A. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Espectro 4: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do intermediário 1B pelo método A. Solvente utilizado: CDCl_3 .

✓ Glicerol

O intermediário IC é obtido pela esterificação entre o álcool e o ácido carboxílico de glicerol e ácido málico protegido, respectivamente. Ao término da reação, a cromatografia em camada delgada mostrou a formação de mancha com valor de R_f igual a 0,46, diferente dos materiais de partida, glicerol e ácido málico protegido de R_f 0,11 e 0,57, respectivamente. O espectro de RMN ^1H (Espectro 5) mostrou a presença de sinais em 1,60 e 1,62 ppm, correspondentes a hidrogênios das metilas da lactona do ácido málico protegido. Neste espectro, observam-se, também, sinais próximos de 2,60 ppm, que caracterizam o ácido

málico protegido. Além disso, apareceram sinais do glicerol próximos de 3,30 ppm referentes a H_{1A} e H_{3A} e em 3,60 ppm indicativo do H_{2A} .

No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 6) observam-se sinais em 25,31 e 25,50, 26,32 e 26,65 ppm, que caracterizam os carbonos das metilas do ácido málico protegido. Ainda em relação ao espaçante, os sinais próximos de 35, 70 e 110 ppm podem ser referentes aos carbonos 5, 2 e 3 do ácido málico protegido, respectivamente. Em adição, os sinais entre 170,45 e 172,34 ppm correspondem às carbonilas do ácido málico protegido e da função éster formada. Os sinais referentes aos carbonos do glicerol apareceram em 65,45, 66,57 e 69,47 ppm. Portanto, estes resultados sugerem que, possivelmente, com glicerol, obteve-se o intermediário 1C.

Espectro 5: Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do intermediário 1C pelo método A. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Espectro 6: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do intermediário 1C pelo método A. Solvente utilizado: CDCl_3 .

4.1.2 Método B

Na busca por métodos que apresentem produto mais puro, utilizou-se a síntese de com *N*-metilmorfolina (como catalisador) e cloroformato de etila, como agente condensante. Foram realizados os experimentos com etilenodiamina, etilenoglicol e glicerol para reagir com ácido málico protegido, nas devidas proporções molares, para obter o maior número de substituições possíveis dos respectivos produtos (amida e ésteres).

As placas cromatográficas dos experimentos mostraram a formação de mancha com R_f igual a 0,66, valor diferente dos materiais de partida que apresentam valores de R_f 0,12, 0,35, 0,11 e 0,57, que correspondem, respectivamente, à etilenodiamina, etilenoglicol, glicerol e ao ácido málico protegido.

O espectro RMN ^1H do experimento com etilenodiamina (Espectro 7) mostrou sinais da presença de ácido málico protegido, como os singletos em 1,86 e 1,87 ppm, relativos aos hidrogênios metílicos, sinais entre 2,58 e 2,76 ppm e próximos de 4,50 ppm, relacionados aos hidrogênios H2 e H3, respectivamente, do ácido málico protegido, porém não se identificaram os sinais de etilenodiamina. Não se obteve, portanto, o produto desejado.

Nesta reação, forma-se intermediário sintético, o anidrido misto, que se mostrou estável e não sofreu ataque nucleofílico da etilenodiamina. Portanto, a substituição não ocorreu e o que se observa no espectro é a presença deste intermediário de síntese. Os sinais em 1,13 e 1,44 ppm e próximos a 4,00 ppm estão relacionados aos hidrogênios de CH3 e de CH2 (ligados ao oxigênio da função anidrido), presentes neste intermediário. Em adição, o espectro de RMN ^{13}C (Espectro 8) mostrou a presença deste intermediário, devido aos sinais em 14,06, 61,21 e 169,13, 171,29 ppm relativos aos CH3, CH2 e às carbonilas do anidrido misto, respectivamente. Além disso, estão presentes os sinais referentes ao ácido málico protegido em torno de 25-26, 35, 70, 110, 164-170 ppm, referentes, respectivamente, aos carbonos das metilas da lactona (C6 e C7), C5, C2, C3, C1 e C4 desse derivado.

Realizaram-se, também, os experimentos com etilenoglicol e glicerol, para obtenção dos respectivos ésteres. Com estes experimentos, obtiveram-se resultados análogos ao experimento com etilenodiamina, ou seja, a formação do intermediário sintético, que demonstrou estabilidade em não sofrer ataque nucleofílico para a síntese do éster desejado.

Espectro 7: Espectro de RMN ^1H (300 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do intermediário 1A pelo método B. Solvente utilizado: CDCl_3 .

Espectro 8: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz) do produto impuro da reação para obtenção do intermediário 1A pelo método B. Solvente utilizado: CDCl_3 .

5 CONCLUSÕES

As conclusões deste trabalho foram os seguintes:

- ✓ Os intermediários 1A, 1B e 1C, respectivamente, derivados de etilenodiamina, de etilenoglicol e de glicerol, foram obtidos com EDC, embora impuros;
- ✓ Não se obteve sucesso na síntese dos intermediários com *N*-metilmorfolina e cloroformato de etila;
- ✓ Novas metodologias deverão ser desenvolvidas na tentativa de obtenção dos intermediários puros.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. *Revista Analytica*, v.26, p.56-62, 2007.
- D'EMANUELE, A.; ATTWOOD, D. Dendrimer-drug interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.57, p.2147-2162, 2005.
- GIAROLLA, J. *Pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofural potencialmente antichagásicos*. Estudo de condições sintéticas para a primeira geração. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007, 155p [Dissertação de Mestrado].
- GOLDBERG, D.S.; GHANDEHARI, H.; SWAAN, P.W. Cellular entry of G3.5 poly(amido amine) dendrimers by clathrin- and dynamin-dependent endocytosis promotes tight junctional opening in intestinal epithelia. *Pharmaceutical Research*, v.27, p.1547-1557, 2010.
- MORRISON, L.R. *Encyclopedia of Chemical Technology*. New York: Wiley, 1994. p.921-932.
- TOMALIA, D.A.; BAKER, H.; DEWALD, J.; HALL, M.; KALLOS, G.; MARTIN, S.; ROECK, J.; RYDER, J.; SMITH, P. A new class of polymers: starburst dendritic macromolecules. *Polymer Journal*, v.17, p.117-132, 1985.
- VARGAS, F. *Síntese e aplicação de β -calcogeno amidas quirais em alquilações alílicas assimétricas*. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p.188, 2007. [Tese de Doutorado].

ANEXO IV

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 V

ATIVIDADES ACADÊMICAS

ATIVIDADES ACADÊMICAS

Resumo das atividades acadêmicas desenvolvidas:

- Publicações dos artigos

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

(2) GIAROLLA, J.; RANDO, D.G.; PASQUALOTO, K.F.M.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling as a promising tool to study dendrimer prodrugs delivery. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v.939, p.133-138, 2010;

(3) 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*, v.7, 191-195, 2010;

(4) RANDO, D. G.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K. F. M.; FERREIRA, E. I. Chalcones and *N*-acylhydrazones: direct analogues? Exploratory data analysis applied to potential antileishmanial new agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.46, p.311-321, 2010;

(5) GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; RANDO, D.G.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling study on the disassembly of dendrimers designed as potential antichagasic and antileishmanial prodrugs. *Journal of Molecular Modeling*, 2011 (aceito).

- Depósito de pedido de patente

- ✓ Pró-fármaco dendrimérico, Processo para sua preparação e composições contendo os mesmos. Protocolo de nº. 018070068714 junto à delegacia do INPI. 2008.

- Doutorado sanduíche

- ✓ *University of Central Lancashire*, Inglaterra, sob supervisão do Professor Titular Antony D'Emanuele (agosto a dezembro de 2011).

- Participações em eventos:

- ✓ *Cursos*

(1) Curso: "Procedimientos biológicos para el tamizaje de compuestos con potencial actividad sobre *Trypanosoma cruzi*", Paraguai, 2008;

(2) Curso: "Aplicação da metodologia de QSAR-4D usando o programa LQTA-QSAR, UNICAMP-Campinas, 2009.

- ✓ *Comunicações em Reuniões Científicas*

(1) The Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry

- GIAROLLA, J.; RANDO, D.G.; PASQUALOTO, K.F.M.; ZAIM, M.H., FERREIRA, E.I. Molecular modeling studies of potentially antichagasic and antileishmanial dendrimer prodrugs, Porto de Galinhas – PE (2008);

- RANDO, D.G.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Chalcones and *N*-acylhydrazones: direct analogues? Exploratory data analysis applied to potential antileishmanial new agents, Porto de Galinhas – PE (2008);

- SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide, Ouro Preto - MG (2010).

(2) Semana de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

- GIAROLLA, J.; RANDO, D.G.; PASQUALOTO, K.F.M.; ZAIM, M.H., FERREIRA, E.I. Molecular modeling studies of potentially antichagasic and antileishmanial dendrimer prodrugs (2009);

- GIAROLLA, J.; RANDO, D.G.; PASQUALOTO, K.F.M.; ZAIM, M.H., FERREIRA, E.I. Modelagem molecular em estudos de liberação de dendrímeros potencialmente

antichagásicos e leishmanicidas (2010);

- PUPO, J.O.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular em estudos de liberação de pró-fármacos dendriméricos potencialmente antibacterianos (2010);

- SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling applied to the first generation of quercetin targeted dendrimer as drug delivery system (apresentação oral e poster, 2011).

(3) Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP

- GIAROLLA, J.; RANDO, D.G.; PASQUALOTO, K.F.M.; ZAIM, M.H., FERREIRA, E.I. Modelagem molecular em estudos de liberação de dendrímeros potencialmente antichagásicos e leishmanicidas (2010);

- PUPO, J.O.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular em estudos de liberação de pró-fármacos dendriméricos potencialmente antibacterianos (2010);

- SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular na liberação de fármacos dendriméricos dirigidos de quercetina de primeira geração (2011).

(4) Molecular Modelling – 2010: Advances in Biomolecular and Materials Modelling (MM2010), Melbourne, Austrália

- GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; RANDO, D.G.; ZAIM, M.H., FERREIRA, E.I. A molecular dynamics study of dendrimeric prodrugs potentially antichagasic and antileishmanial (2010);

- SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling as a tool for studying a potentially leishmanicide targeted dendrimer (2010).

(5) ACS (American Chemical Society): 241st ACS National Meeting & Exposition, Anaheim, USA

- GIAROLLA, J.; RANDO, R.G.; PASQUALOTO, K.F.M.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling as a tool for the structural stability evaluation of dendrimeric prodrugs (2011).

(6) Escola Brasileira de Modelagem Molecular, Santo André, SP

- SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide (2011).

(7) International Seminar of Nanotechnology, São Paulo, SP

- SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling as a tool for studying a potentially leishmanicide targeted dendrimer (2011).

(8) II International Symposium on Drug Discovery, Araraquara, SP

- SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling applied to the first generation of quercetin targeted dendrimer as drug delivery system (2011).

(9) São Paulo School on Natural Products, Medicinal Chemistry and Organic Synthesis – Integrated solution for tomorrow's world (ESPCA Chemistry), Campinas, SP

- SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide (2011).

(10) II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, São Paulo, SP

- SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide (2011).

- Colaboração na orientação de trabalhos de Iniciação Científica:

- Janaína Oliveira Pupo: "Planejamento e síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente antibacterianos", fevereiro 2009 a agosto 2010.

- Patricia Vieira Sotelo: "Planejamento e síntese de pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofural potencialmente antichagásico", bolsista CNPq, fevereiro 2010 a maio 2011.

- Andressa Polidoro: "Síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos de cardiovasculares", setembro 2010 a maio 2011.

- Colaboração na orientação de dissertações de mestrados:

- Soraya da Silva Santos: “Leishmanicidas potenciais: síntese de fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração com hidroximetilnitrofural”, bolsista FAPESP, em andamento;
- Andressa Polidoro: Síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente cardiovasculares contendo rosuvastatina e ácido acetilsalicílico”, bolsista FAPESP, em andamento.

- Organização de eventos

(1) FERREIRA, E.I.; AMBRIZZI, T.; DECHEN, A.R.; SILVA, A.M.; DARCE, M.A.B.R.; MIGLINO, M.A.; YAGUI, C.O.R.; TAVARES, L.C.; ANDRADE, C.H.; BRITO, C.L.; RANDO, D.G.; TROSSINI, G.H.G.; BIGATAO, H.M.; GIAROLLA, J.; BOTELHO, K.C.A.; TURRA, K.M.; SCOTTI, L.; GUIDO, R.V.C.; SERAFIM, R.A.M.; OTELO, V.A. Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, São Paulo, 2009;

(2) FERREIRA, E.I.; TROSSINI, G.H.G.; ADRICOPULO, A.D.; POLIDORO, A.; VAZ, B.A.; BRITO, C.L.; SILVA, F.T.; GIAROLLA, J.; LEMES, J.P.; PACHIONI, J.; ARRIBAS, M.A.G.; PRIMI, M.C.; SA, M.M.; SEGRETTO, N.; SERAFIM, R.A.M.; SANTOS, S.S.; OTELO, V.A. II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas, São Paulo, 2011.

Review

Prodrugs for the Treatment of Neglected Diseases

Man Chin Chung ^{1,*}, Elizabeth Igne Ferreira ^{2,†}, Jean Leandro Santos ^{1,2}, Jeanine Giarolla ², Daniela Gonçalves Rando ², Adélia Emília Almeida ¹, Priscila Longhin Bosquesi ¹, Renato Farina Menegon ¹ and Lorena Blau ¹

¹ Lapdesf - Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP Rodovia Araraquara-Jaú Km 1, 14801-902, Brazil

² LAPEN – Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos em Endemias Tropicais, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP/SP, R. Prof. Lineu Prestes, 580, B-13S, Cidade Universitária, São Paulo, 05508-900, Brazil; [†] E-mail: elizabeth.igne@gmail.com

* Author to whom correspondence should be addressed; E-mail: chungmc@fcfar.unesp.br

Received: 11 January 2008; in revised form: 12 March 2008 / Accepted: 12 March 2008 / Published: 19 March 2008

Abstract: Recently, World Health Organization (WHO) and Medicins San Frontieres (MSF) proposed a classification of diseases as global, neglected and extremely neglected. Global diseases, such as cancer, cardiovascular and mental (CNS) diseases represent the targets of the majority of the R&D efforts of pharmaceutical companies. Neglected diseases affect millions of people in the world yet existing drug therapy is limited and often inappropriate. Furthermore, extremely neglected diseases affect people living under miserable conditions who barely have access to the bare necessities for survival. Most of these diseases are excluded from the goals of the R&D programs in the pharmaceutical industry and therefore fall outside the pharmaceutical market. About 14 million people, mainly in developing countries, die each year from infectious diseases. From 1975 to 1999, 1393 new drugs were approved yet only 1% were for the treatment of neglected diseases [3]. These numbers have not changed until now, so in those countries there is an urgent need for the design and synthesis of new drugs and in this area the prodrug approach is a very interesting field. It provides, among other effects, activity improvements and toxicity decreases for current and new drugs, improving market availability. It is worth noting that

it is essential in drug design to save time and money, and prodrug approaches can be considered of high interest in this respect. The present review covers 20 years of research on the design of prodrugs for the treatment of neglected and extremely neglected diseases such as Chagas' disease (American trypanosomiasis), sleeping sickness (African trypanosomiasis), malaria, sickle cell disease, tuberculosis, leishmaniasis and schistosomiasis.

Keywords: Tropical neglected diseases, Prodrug design, American trypanosomiasis, African trypanosomiasis, Malaria, Sickle cell disease, Tuberculosis, Leishmaniasis, Schistosomiasis.

Introduction

Billions of dollars are invested each year in research and development (R&D) of drugs for conditions that affect people who can pay, which include obesity, baldness, and ageing. However, the World's poor are left completely marginalized. Tropical infectious diseases, including protozoan infections, helminths, as well as other diseases such as sickle cell disease are known as neglected diseases [1,2]. Recently, these diseases were officially classified as neglected and/or extremely neglected diseases by the World Health Organization and Medicins San Frontieres. They affect areas of extreme poverty and are themselves poverty promoting. For this very reason, they fail to attract attention from the drug developers, who do not consider this group of diseases as a lucrative target [3,4]. The market logic is: no profit, no investment [5].

Only 10% of global health research is related to diseases that account for 90% of the global disease burden, which urgently need new drugs. From 1975 to 1999, 1,393 new drugs were launched in the market, but only 16 (1%) were for the treatment of tropical diseases [3]. Science has advanced in biology, molecular biology and also genetics of the etiologic agents that cause those diseases. However, this knowledge has not been used for drug design [6] and this is not acceptable.

Different basic approaches to drug discovery for tropical diseases included combinations of existing drugs, new indications for existing drug, improvements to known drugs and compound classes and focused sample collections [7]. The prodrug approach was developed to overcome mainly pharmacokinetics problems of many therapeutic classes of drugs [8;9]. A prodrug is an inactive drug carrier form that requires a metabolic activation step before it exhibits its pharmacological effects in a target tissue. It can provide reduced toxicity, improved therapeutic index, slow release of the parent drug and also improved selectivity towards the target tissue or cell. In this work we have focused in prodrugs for the following neglected diseases: Chagas' disease, sleeping sickness, leishmaniasis, malaria, schistosomiasis, tuberculosis and sickle cell disease.

Chagas' disease

In 1909 Carlos Chagas discovered American trypanosomiasis, commonly known as Chagas' disease, which is a parasitosis caused by *Trypanosoma cruzi*. The disease is mostly spread throughout Latin America, affecting 21 countries [10]. It is estimated that some 16 to 18 million people are infected by the parasite and 50,000 people die annually as a consequence of the illness [11]. Chagas' disease remains essentially incurable. The pharmaceutical industry has had limited interest in developing new antichagasic drugs, due principally to a lack of commercial incentives [12]. Benznidazole and nifurtimox are the available drugs for the treatment of this parasitosis. However, both drugs are toxic nitroheterocyclic derivatives and almost only effective in the acute phase of the disease. They have been used as long-term treatment [13]. These drugs cure only a very low percentage of chronic patients [12] and natural resistance of *T. cruzi* to nitro derivatives has been suggested as an important factor to explain the low rates of cure detected in chagasic patients [12]. Thus, a search for new drugs against *T. cruzi* is of utmost importance and must be emphasized.

Sleeping sickness

Human African Trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness, is caused by infection with parasitic protozoa of the *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) subspecies, which are introduced to the human bloodstream by the bites of infected tsetse flies in the inter-tropical regions of Africa. *Trypanosoma brucei gambiense*, found in West and Central Africa, leads to a chronic form of the disease [14]. Over 60 million people living in 36 countries are at risk of acquiring sleeping sickness and the estimated number of people affected is between 300,000 and 500,000 [15].

Chemotherapy of African trypanosomiasis is still based on old drugs and some of these show toxic side effects. Suramin and pentamidine are the drugs of choice against the Rhodesian and Gambian forms of the disease, respectively, before the onset of central nervous system symptoms. Late-stage disease is treated with the melaminophenyl arsenical drug melarsoprol. In the case of the disease caused by *T. b. gambiense*, eflornithine (DFMO) is also used [16]. New drugs are urgently needed for human African trypanosomiasis and the emergence of drug resistance is likely to be a challenge that must be faced.

Leishmaniasis

Parasites from *Leishmania* genus are the causative agents of leishmaniasis, a group of protozoan diseases transmitted to mammals, including human beings, by phlebotomine sandflies. Globally, there are an estimate of 350 million people that are at risk of infection and disease [17]. Among all parasitic infections, it is considered the second most important from the socioeconomics point of view. It affects 12 million people in 88 countries, there are 1.5–2 million new cases and 70,000 deaths each year, and 350 million are under the risk of contamination [17]. Only malaria and schistosomiasis, respectively, present more expressive numbers than leishmaniasis [18, 19].

The clinical forms of the disease range from cutaneous leishmaniasis to the most severe visceral infection (known as kala-azar in India), fatal if untreated [20]. Chemotherapy for leishmaniasis is

scarce and limited to pentavalent antimonials, pentamidine, amphotericin B, miltefosine, fluconazole and few other drugs at various stages of their development process [21-23], drugs with undesirable side effects. The latter and the emergence of drug resistance have been the driven force to researchers to search for new potential compounds [24-26].

Malaria

Malaria is a life-threatening parasitic infection caused by parasites of genus *Plasmodium* -- *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae* – from which *P. falciparum* is the only one capable of producing fatal complications. Over three billion people live under the threat of malaria and it has been estimated that there are 300 to 500 million new cases of malaria resulting in approximately two million deaths per year. The majority of these cases occur in the poorest countries [27]. With the absence of an effective vaccine and global emergence of multidrug resistance, malaria continues to be a worldwide epidemic. Resistant strains of malaria have been identified for most of the antimalarial drugs in clinical use today [28]. Many drugs, alone or in combination – chloroquine, primaquine, mefloquine, halofantrine, artemisinin, atovaquone, among others – have been used for malaria chemotherapy. However, drug or multi-drug resistance has been a challenge for chemotherapy effectiveness [29]. The need for drugs against asexual forms as well as the emergence and spread of resistance against chloroquine and other major antimalarial drugs have brought the urgency to develop a new generation of safe and effective agents [1].

Schistosomiasis

Schistosomiasis is caused by a trematode of the genus *Schistosoma* and five major species, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum* and *S. mekong*, infect humans. It is estimated that two billion people are chronically infected with soil transmitted helminths and schistosomes, many suffering from severe morbidity. World Health Organization has estimated that some 200 million people are infected, a further 600 million people are at risk of infection and more than 200,000 deaths per year occur just from schistosomiasis [30]. It ranks second only to malaria considering the extent of endemic areas and the number of infected people. It is distributed in around 52 countries in South America, Caribbean, Africa and East Mediterranean. The intermediate host of the parasite is a snail widespread in fresh water, and it is skin contact with this water that permits infection. Schistosomiasis represents both public health and socioeconomic challenges.

Chemotherapy has become the most effective means of endemic disease control and therapeutic drugs available are: metrifonate, oxamniquine and praziquantel. In some countries only oxamniquine and praziquantel are used. The latter has been the drug of choice as it is effective against all human schistosomes. However, there is considerable concern about the development of resistance. Oxamniquine is used as second drug of choice, due to its side effects, mainly those associated to CNS [30]. Since vaccine development is still far from practical application, the design of new schistosomicide drugs are urgently needed. However, as in other neglected diseases, this is too expensive and is not economically attractive to industry [31].

Tuberculosis

Parallel to the tropical endemic diseases, tuberculosis (TB) appears as great challenge for the world-wide organizations and related groups of research involved in health. TB is the most serious infectious lung disease in the world and the leading cause of death from a single infectious organism. It is spreaded worldwide but affects mainly African regions. It was estimated that it maintains hidden in two billion people [32] and between 2005 and 2020, one billion people will be newly infected, over 125 million people will get sick, and 30 million will die of TB if control is not further strengthened [33]. HIV infection, which compromises cell-mediated immunogenicity [34], increases to 50% the percentage of people infected with *M. tuberculosis* who would develop active TB during a shortened lifetime [35]. This and the growing TB emergence of drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* [36] has been the major challenges and claim, urgently, for new and better drugs.

Sickle cell disease

Sickle cell disease (SCD), an inherited disorder of haemoglobin synthesis, is a single point mutation that substitutes valine for glutamic acid in the β -globin subunit [37]. It causes deformation of the red blood cells that can result in vaso-occlusive events [38], ischaemia and tissue and organ damage as well [39,40] and can be fatal. This condition is prevalent mainly in tropical areas and predominates in Africa. Millions of people throughout the world have been affected with this disease, mainly from Sub-Saharan Africa, Latin America, United States, Saudi Arabia, India, and Mediterranean countries as Turkey, Greece, and Italy. The sickle gene has however have a genetic advantage: it protects heterozygous carriers from succumbing to endemic *Plasmodium falciparum* malaria infection [41]. Hydroxyurea is the only US Food and Drug Administration (FDA)-approved drug for the treatment of SCD. Some compounds have been studied for sickle cell treatment like: butyric acids, aldehydes, decitabine, clotrimazole, L-arginine, zileuton [42-44].

For most of the neglected diseases the improvement of pharmaceutical, pharmacokinetic or even pharmacodynamic profile of the existant drugs using molecular modification processes is a recommended alternative. From those methods, prodrug design is one of the most promising [9,45]. We describe, in this paper, the main results of 20 years of research into prodrug design against some neglected diseases.

Antichagasic prodrugs

Prodrugs of primaquine and nitrofurazone

Chung, in 1996, synthesized mutual prodrugs of primaquine (PQ) and nitrofurazone (NF) using dipeptides as spacer groups. These peptides are selectively cleaved by cruzipain, a cysteinyl-protease found only in *T. cruzi* [46]. The rationale for this approach was the mechanism of the drugs: while primaquine increases the oxidative stress into the parasite, nitrofurazone (NF), as a trypanothione reductase inhibitor [47], does not allow the protective action of the enzyme, provoking the increase in

the intracellular oxidative stress. The compound in which Lys-Arg was the spacer group has been the most active (Figure 1).

Figure 1. Chemical structure of the mutual prodrug of nitrofurazone and primaquine and its conversion to the parent drugs by cruzipain.

Dipeptide prodrugs of primaquine as synthesis intermediates were also shown to be active on LLC-MK2 cell culture infected with trypomastigotes forms of *T. cruzi*. It was demonstrated that Lys-Arg-PQ is active on *T. cruzi* development inside host cells, probably by interfering in the initial steps of trypomastigote-amastigote transformation. It was found that Lys-Arg-PQ is more active than Phe-Ala-PQ and Phe-Arg-PQ, suggesting that the specific cleavage has an important role in the release of PQ. The dipeptide Lys-Arg, putatively specific for cruzipain, was a good carrier for PQ and has potential to be used as a spacer group for the development of other PQ prodrugs in the future (Figure 2). Thus, Lys-Arg-PQ is a very promising compound for *in vivo* tests [48].

Figure 2. Chemical structures of dipeptide prodrugs of primaquine.

T. cruzi trypanothione reductase has been considered a key enzyme in the oxidative metabolism of the parasite [47] and nitrofurazone derivatives have shown to produce irreversible inactivation of that enzyme under anaerobic as opposed to aerobic conditions. Hydroxymethyl derivatives are prodrugs whose main goal is to provide more hydrophilic derivatives than the parent compound. In general, NH acidic drugs such as amides, imides and ureides are potential targets to *N*-hydroxymethylation [49]. Chung synthesized the nitrofurazone hydroxymethyl derivative (NFOH) (Figure 3), as a synthesis intermediate of mutual prodrugs of primaquine and nitrofurazone, potentially active in Chagas' disease. This compound was shown to be highly active in cell cultures infected with *Trypanosoma cruzi* and much less toxic than the drug, when submitted to Ames' mutagenicity test [50].

Figure 3. Chemical structures of nitrofurazone and its prodrug hydroxymethyl nitrofurazone.

The chemical hydrolysis at pH 1.2 and 7.4 showed that NFOH was completely converted to NF within 16 hours; however the recovery of NF occurs just 1 hour after hydrolysis. This fact suggests that the conversion of NFOH into NF is carried out by a two-step pathway, in which there is the formation of an intermediate compound. The half-life at pH 1.2 was about 1.5 hours while at pH 7.4 it takes 134 hours to be 50% hydrolyzed with no formation of an intermediate compound. These facts suggest the great stability of this compound at physiological pH [50].

Later, the group extended their studies with NFOH and dipeptidic prodrugs to other fields. Molecular modeling studies have been performed to evaluate possible interactions between the prodrugs and cruzain, one of the possible molecular targets of these derivatives [51]. The AM1 study suggests that the amino acid nature and dipeptide sequence are determinant for the approximation and nucleophilic attack of cruzain, as observed in the irreversible inhibitors model. Steric and electrostatic interactions in the double prodrugs indicate the spacer group AlaPhe as the most favorable sequence relative to PheAla. In addition, the LysArg spacer group seems to be the best substrate for the enzyme.

Semi-empirical AM1 studies were applied to the mutual dipeptide prodrugs of primaquine and nitrofurazone to understand the release of the drugs by cruzain. The work suggested that the amino acid sequence is determinant to this release. The volume and electronic nature of the aromatic nucleus of Phe, comparatively to those of Ala, and the possibility of steric and electrostatic interactions between the side chains of the amino acids and the drugs lead to different rearrangements that allow or avoid cruzain approximation and attack [52].

Also, in order to find the reason of higher activity of NFOH than NF, the voltametric behaviour of the drug and its prodrug was also determined by Scalea and co-workers [53]. No differences have been detected in the reduction capability of the nitro group.

Prodrugs of N-isopropyl oxamate

Trypanosoma cruzi possesses an enzyme similar to the lactate dehydrogenase isozyme-x (LDH-C4) from mammalian spermatozoa [54]. This enzyme has two molecular forms (HADH-isozyme I and HADH-isozyme II). Isozyme I is responsible for the weak lactate dehydrogenase activity found in *T. cruzi* extracts [55], while isoenzyme II is not active against pyruvate but on many linear and branch chain substrates, especially α -ketoisocaproate [56]. Its similarity to LDH-C4 leads to analogous functions in *T. cruzi* [57]. These enzymes display a role in supplying energy for the motility of the flagellum and the survival of the parasite [56;57]. This hypothesis was advanced based on the structural similarity between *N*-isopropyl oxamate (NIPOx) and the substrate α -ketoisocaproate (Figure 4).

Elizondo and co-workers (2003) have investigated and demonstrated that NIPOx was a selective inhibitor of HADH-isozyme II from *T. cruzi*. However, this compound did not show any activity when tested on V2R *T. cruzi* epimastigote culture, unless it was transformed in its prodrug, the ethyl ester of *N*-isopropyl oxamate (Et-NIPOx). Actually, it was even better than nifurtimox and benznidazole [58]. A hypothesis advanced to explain this effect was the existence of carboxylesterases, aliphatic or non-specific esterases, in *T. cruzi* epimastigotes [59].

Figure 4. Chemical structures of α -ketoisocaproate, NIPOx and Et-NIPOx.

Increased effectiveness of Et-NIPOx most probably resulted from their better absorption by this parasite and its efficient hydrolysis by carboxylesterases *in situ* into the active HADH inhibitor [58]. This was later also confirmed *in vivo* [60], when Et-NIPOx was tested on mice parasitaemia, exhibiting trypanocidal activity in the five tested *T. cruzi* strains. It is worth to note that benznidazol and nifurtimox, submitted to the same test, were active only against three out of five tested *T. cruzi* strains, probably due to natural resistance of the parasite to nitroderivatives [61].

Prodrugs for Sleeping Sickness

ADEPT approach and mAb-drug conjugate for treatment of African trypanosomiasis

Trypanosomes protect themselves from host immune responses by continuously changing the VSGs that cover their entire membrane, lowering the possibility of developing a conventional vaccine [62–64]. Thus, it is important to search for chemotherapeutics to treat sleeping sickness (African trypanosomiasis).

Antibody-Directed Enzyme Prodrug Approach, ADEPT, is one of the highest mean to accomplish selectivity in the prodrug design field [65]. It requires monoclonal antibodies and enzymes that are not common in the mammalian host. The system requires two phases: first, an interaction of the conjugate enzyme-antibody with the antigen and second, the release of drug from classical prodrug by the enzyme of the previous conjugate. One of the most used enzymes in the conjugate has been β -lactamase along with cephalosporins as the carrier for the second phase. Pratt [66] has shown that when cephalosporins are hydrolysed by a β -lactamase the C-3' substituent is expelled depending on its leaving-group reactivity (Figure 5).

In the case of African trypanosomiasis, isolation of a monoclonal antibody reactive toward multiple VSGs on viable parasites has been a challenge, as the conserved epitopes become cryptic upon the assembly of VSGs on the membrane of the parasite. To circumvent this problem, Stijlemans and co-workers developed an ADEPT approach potentially useful for the treatment of African

trypanosomiasis using a nanobody named *NbAn33*, a *mAb* specific for the conserved carbohydrate epitope of VSGs fused to a β -lactamase enzyme for activation of a cephalosporin mustard prodrug [67,68]. Nanobodies were introduced by Stijlemans and co-workers [69] and are antigen-binding fragment with a molecular mass of only 15 kDa, coming from the serum of *Camelidae* which contains a high proportion of functional antibodies with no light chains [70]. The *in vitro* assay was carried out with sub-lethal doses of 0.5 to 10 μ M of the prodrug following the incubation with the *NbAn33*:: β -lactamase conjugate and succeeded.

Recently a human-specific serum protein, apoL-I, was found to be the trypanolytic factor of normal human serum (NHS) [71;72]. Also, it was discovered that trypanosomes become resistant to NHS after expression of the apoL-I-neutralizing serum resistance-associated (SRA) protein [73]. Based on these findings, a Tr-apoL-I, which cannot be neutralized by SRA and thus is capable of lysing both NHS-sensitive and NHS-resistant *T. b. rhodesiense* [74], was obtained. This compound is a natural trypanolytic agent that can be useful to cure *T. b. rhodesiense* infections providing its targeting Tr-apoL-I to the parasite surface could improve its effectiveness.

According to this and considering the nanobody approach and the use of *NbAn33* as a trypanosoma monoclonal antibody [69], Baral and co-workers [75] tested the performance of *NbAn33*-Tr-apoL-I in mouse models of African trypanosomiasis and the promising results allowed them to conclude a new trypanocidal modality for the human parasitosis treatment had been developed. The successful use of single domain antibody derivatives to combat trypanosomiasis could also be repeated to various other infectious agents.

Figure 5. ADEPT approach for African trypanosomiasis.

Prodrugs of aromatic diamines

Aromatic diamines represent a class of compounds with broad-spectrum antimicrobial activity. DB75 [2,5-bis(4-amidenophenyl)furan] is an important aromatic diamine that is active against *Trypanosoma* sp *in vitro* [76;77] and DB289 [2,5-bis-(4-amidinophenyl)furan bis-*O*-methyl-

amidoxime] is its orally active amidoxin prodrug (Figure 6). The latter is in phase IIb human clinical trials for treatment of early-stage human African trypanosomiasis, *Pneumocystis jiroveci carinii* pneumonia and malaria. Charlotte and co-workers found that mitochondrion is a cellular target of DB75 in yeast cell. This finding can aid in the target-based design of new antimicrobial aromatic diamines [62].

Figure 6. Chemical structures of DB75 and its prodrug DB289.

Prodrugs for Leishmaniasis

Glutathione prodrugs

Trypanothione plays a central role in the metabolism of trypanosomatids, like *T. brucei*, *T. cruzi* and *L. donovani*, acting both as a source of reducing equivalents and as a defense against oxidative stress [78]. Diester compounds *per se* were considered to be ineffective inhibitors of trypanothione metabolism, suggesting that these compounds might act as prodrugs, increasing the membrane penetration of glutathione derivatives prior to cleavage into possible glutathione derivatives, which includes combinations of monoesters, free acids, and amines, some of which are inhibitors of trypanothione metabolism [78]. The dibutyl ester compound presented in Figure 7 shows moderate activity against *L. donovani* in an *in vitro* assay, and a higher activity against *T. brucei*.

Figure 7. Diester prodrug of glutathione derivative with antileishmaniasis activity.

Thermolytically activated oligonucleotide prodrugs

Oligonucleotides such as those containing unmethylated CpG dinucleotides are known to trigger vertebrate immune system through the activation of Toll-like receptor 9 (TLR-9) [79,80]. The resulting innate immune response limits the early spread of infectious organisms, while promoting the development of adaptative immunity. These dinucleotides show promise as vaccine adjuvants and to improve clinical outcome in *rhesus* macaques challenged with *L. major* [79,80]. The administration of such compounds can improve the host response to parasitic, bacterial and viral infection in animal models [80-82]. Prodrugs of those oligonucleotides have been designed to facilitate cellular uptake, allowed them to have increased resistance to hydrolytic nucleases.

Grajowski and co-workers [83] reported the synthesis and characterization of a CpG ODN functionalized with thermolytic 2-(*N*-formyl-*N*-methyl)aminoethyl (*fma*) phosphorothioate triesters (Figure 8). Those compounds are activated only by temperature (37 °C). The half-life of thiophosphate deprotection was estimated to be 73 h and the complete deprotection was achieved within 600 h. Studies in mice infected with *Leishmania major* metacyclic promastigotes [83] prove that CpG ODN *fma*1555 was as effective as that of CpG ODN 1555 in reducing the size of *Leishmania* lesions in local intradermal administration.

Figure 8. Thermolytic activation of CpG ODN *fma*1555

Previous studies demonstrated that administration of ODN type D, which has a 3' and poli(G) motif [84] – a group of guanine ribonucleotide with phosphate residues acting as bridges to form diester linkages between the ribose moieties – improves its performance in healthy and immunocompromised non-human primates challenge with *Leishmania major* [85;86]. However, this structure can lead to product polymorphisms, aggregation and precipitation, which negates their clinical applications [87-89]. A prodrug form of CpG ODN type D (Pro-D ODN) with *fma* groups was developed by Puig and co-workers [90]. The resultant prodrug (pro-D35, Figure 9) demonstrated the immunoprotective activity of pro-D ODN when applied to macaques infected with *L. major*.

Figure 9. Thermolytic activation of Pro-D35.

Pyrimethamine polymer prodrugs

Although classic antifolate drugs, such as pyrimethamine, have been used with success in most protozoan diseases, some of them have not been effective when applied to leishmaniasis [91]. Pterins are a chemical class that plays an important role in mammalian folate pathways. Bello and co-workers [92] identified a *L. major* pteridine reductase enzyme (PTR1) that reduces pterins to their tetrahydro derivatives, reducing folic acid to tetrahydrofolic acid. This enzyme is an alternative to the folate pathway, which explains the parasites resistance to the classic DHFR inhibitors [93]. This represents a new and potential target to be considered. Pyrimethamine, an antimalarial drug, was found to be able to inhibit both enzymes (DHFR-TS and PTR-1) of the leishmanial folate pathway, although this effect *in vivo* appears only in relatively high concentrations [94].

Figure 10. Chemical structure of the prodrugs CMD-P and SD-P.

Based on that finding and on *Leishmania* amastigotes living inside mammal's macrophages [95], where mannose receptors are found on the surface membrane [96], Carvalho and co-workers [94] have synthesized targeted drugs of pyrimethamine, carboxymethyldextran-thiomannopyranoside-pyrimethamine (CMD-P), and succinyldextran-thiomannopyranoside-pyrimethamine (SD-P) (Figure 10), in order to release the drug into those cells. The targeted drugs were tested against macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* amastigotes in the presence or absence of CMD-P and SD-P at concentrations ranging from 100 to 200 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h. After treatment with a 200 $\mu\text{g/mL}$ CMD-P dosis a 46,4% reduction of the infection rate was observed and similar results were verified with a lower dosis of CMD-P (100 $\mu\text{g/mL}$). However, SD-P in similar doses did not show good results, probably due to the release of succinylpyrimethamine, still a prodrug, instead of the free drug. Further studies will test the *in vivo* effects of CMD-P prodrug.

Prodrugs of buparvaquone

Various hydroxynaphtoquinones have high antileishmanial activity *in vitro* against species that cause both cutaneous (CL) and visceral leishmaniasis (VL) [97;98]. Buparvaquone is a hydroxynaphtoquinone derivative (Figure 11) more active against *in vitro* than *in vivo* *L. donovani* amastigotes, after subcutaneous administration [97]. Two factors can account for this lack of *in vivo* activity: poor distribution from the site of injection to the intracellular target, when administered subcutaneously, and a combination of low aqueous solubility and high lipophilicity, that lowers the drug bioavailability [99].

Figure 11. Chemical structures of buparvaquone and its prodrugs.

Mäntylä and co-workers [99,100] have synthesized two series of phosphate prodrugs (Figure 11) with the objective to enhance the drug bioavailability, increasing its aqueous solubility. This goal can be reached by the introduction of a phosphate promoiety in a hydroxyl group [101]. Nevertheless, a phosphate carrier protecting a hydroxyl group is not always cleaved enzymatically due to steric

hindrance. Phosphonooxymethyl prodrugs [102,103] can have more lability, due to a two-step hydrolysis reaction, one with enzyme participation and the other with a spontaneous release of the parent drug [99]. Compounds **1a** and **1b** presented a rapid buparvaquone release in alkaline phosphate solution, while only **1b** was able to release the drug in human skin homogenate. These prodrugs had the same potency as buparvaquone against the promastigote and amastigote form of most species investigated. They also presented improved efficacy in *in vivo* *Leishmania major* and *Leishmania donovani* infections [104].

Oxime derivatives **2a-2d** (Figure 11) have also been evaluated *in vitro* [100]. All prodrugs showed increased water solubilities and released corresponding oxime derivative in alkaline phosphate solution. The prodrug phosphonooxymethyl-buparvaquone-oxime (**2b** in Figure 11) was the most interesting, not only because of its high aqueous solubility and chemical stability over a pH range of 3.0 to 7.4, but also due to a quick alkaline phosphatase hydrolysis to the lipophilic parent buparvaquone-oxime. The mechanism of its conversion to buparvaquone (Figure 12) takes place in the body after absorption, probably by a oxidation cytochrome P450 mediated thorough the formation nitrogen oxides formation, including NO, and the corresponding parent compounds containing a C=O group. The generation of NO in addition to the drug may account for the elimination of *Leishmania* [105,106]. This is an interesting example of mixed prodrug-bioprecursor that can be useful to improve physicochemical properties and bioavailability of the drug, besides releasing other therapeutic agent, NO in this case.

Figure 12. The conversion of buparvaquone-oxime into buparvaquone by enzymatic oxidation and release of NO.

Antimalarial prodrugs

Polymeric antimalarial prodrugs

Current antimalarial chemotherapy consists of several compounds mainly active against the bloody form of *Plasmodium* parasites. Nonetheless, the need for drugs against tecdial forms as well as the emergence and spread of resistance against chloroquine and other major antimalarial drugs have brought the urgency to develop a new generation of safe and effective agents [107].

Ferreira and co-workers used polysaccharides as polymeric drug carriers to develop slow releasing prodrugs. The group developed several prodrugs using oxidized polysaccharides of antimalarial drugs

as sulphadoxine, sulphadiazine, dapsone as well as some pyrimidinic derivatives, for instance, pyrimethamine and trimethoprim (Figure 13) [108-110].

Figure 13. Oxidized polysaccharides applied at the development of prodrugs.

These polymeric prodrugs can also present better bioavailability profile and low toxicity when compared to the drug by itself whose problems with bioavailability is questioned as being related to the parasite resistant emergence.

Prodrugs of bisthiazolium salts

Among the targets available for chemotherapeutic design, phospholipid metabolism has been considered as an attractive biochemical step for developing new malaria chemotherapy. It is important for the parasite, is absent from normal mature human erythrocytes [111], and these cells have their content increased by around 500% because of the parasite metabolic activity. Because phosphatidylcholine is the major phospholipids, some monoquaternary and bisquaternary ammonium compounds have been used for malaria chemotherapy, showing exceptional *in vitro* and *in vivo* antimalarial properties, with no mutagenic activity [112,113]. Nevertheless, these compounds, structurally similar to choline, present a cationic group which impairs their oral absorption [114]. Thus, prodrugs that mask the ionizable groups through thioester function were designed and synthesized (Figure 14) [112,113].

Prodrugs TE3, TE4a and TE4gt showed promising results: $IC_{50} < 10$ nM against 3D7 and Nigerian chloroquine (CQ)-sensitive strains and FCB1 and FCM29 CQ-resistant strains; rapid release to the active compounds in plasma and high effectiveness *in vivo*, with $ED_{50} < 4$ mg/kg after intraperitoneal administration. Prodrugs TE4a and TE3 had higher activity (ED_{50} of 11 and 5 mg/kg, respectively) [113].

Figure 14. Chemical structures of bisthiazolium salt prodrugs. *Prodrugs of fosmidomycin and FR900098*

Fosmidomycin (Figure 15), involved in the inhibition of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DOXP) reductoisomerase, an important and specific pathway in the isoprenoid synthesis [115], was shown to be active in recent clinical trials conducted in Gabon and Thailand with uncomplicated *P. falciparum* malaria [116]. Its acetyl derivative is around twice as active *in vitro* against *P. falciparum* [117] and in a *P. vinckei* mouse model [118]. Besides, it inhibited the growth of multidrug resistant *P. falciparum* strains *in vitro* [117].

Figure 15. Chemical structures of fosmidomycin and FR900098.

The problem for both compounds is their poor oral bioavailability, probably because of their low lipophilicity provoked to the high ionization of the phosphono moiety at physiological pH values [118]. In order to overcome this unwanted effect, Reichenberg and co-workers synthesized diaryl ester prodrugs of the acetyl derivative (Figure 16) [119]. The diaryl prodrugs, although more bioavailable in *P. vinckei* infected mice, could release toxic phenol derivatives. Therefore, a series of acyloxyalkyl esters expected to be hydrolysed by non-specific esterases was prepared [120] (Figure 16) and the *bis*[(acyloxy)ethyl]ester was twice more active than the prototype.

Figure 16. Chemical structures of FR900098 ester prodrugs.

Also mono[(acyloxy)alkyl] and *bis*[(alkoxycarbonyloxy)ethyl] esters were prepared and were significantly more active than the parent compound [112,119-121].

Prodrugs of trioxane and dioxane derivatives (endoperoxidic agents)

Artemisinin (qinghaosu) is a sesquiterpene lactone, a 1,2,4-trioxane, which has been used clinically in China for the treatment of multidrug-resistant *P. falciparum* malaria [122]. It is believed that it acts through an interaction with heme, or ferrous ions, in the acidic parasite food vacuole, generating radical species responsible for membrane lipoperoxidation.

Despite the high activity of artemisinin, its clinical use has been limited by the inadequate pharmacokinetic profile. Prodrugs of its active metabolite, dihydroartemisinin, have been designed to improve its properties (Figure 17) [122,123].

Figure 17. Chemical structures of artemisinin, dihydroartemisinin and artesunate sodium salt.

The sodium salt of artesunic acid is a water soluble prodrug, able to reduce parasitemia and to recover comatose cerebral malaria patients [124]. Other artemisinin prodrugs are artemether and arteether, more lipophilic than the parent drug, and also have been used in malaria chemotherapy.

Figure 18. Fe^{II}-catalysed degradation of endoperoxide prodrugs.

Compounds containing two antimalarial pharmacophores, such as a 2,3-dioxane and a cysteine protease inhibitor within the same molecule are part of new approaches using endoperoxide derivatives [125]. O'Neill and co-workers designed dual mechanism [125-128] prodrugs composed of a bicyclo endoperoxide prototype [126] in which the substituents at position 4 in prodrug prototype generates chalcone, through iron (II) mediation, alongside additional noxious species as shown in Figure 18. There are species that look like those generated by artemisinin and related trioxanes and presumably kill the parasite through a similar mode of action, and chalcones, that are considered to be effective antimalarial cysteine protease inhibitors [129].

Prodrugs of 4-aminoquinoline

The glutathione-dependent heme modification is inhibited by chloroquine (CQ) and other related 4-aminoquinolines. This suggest glutathione (GSH) is implied in the development of CQ resistance [130]. Glutathione reductase (GR) displays an important role in glutathione disulfide production and parasite detoxification, and GR inhibitors were proposed to protect from malaria and to reverse the CQ-resistance [131-133]. M₅ is one of GR inhibitors that has a carboxylate function. Prodrugs of 4-aminoquinoline derivatives and M₅ were prepared via an ester bond (Figure 19), that showed to be very stable in biological compartments but releases the drug in the food vacuole of the parasite [132]. The IC₅₀ value of compound A in Figure 19 was 23.1 nM and that of the compound B was 107 nM against FeB1R strain of *P. falciparum* [134]. Compound A presented ED₅₀ values around 30 nM on average. It was equally active against CQ-sensitive and CQ-resistant *P. falciparum* strains.

Figure 19. Chemical structures of M5 and 4-aminoquinoline derivative prodrugs.

Figure 22. Chemical structures of (A) D-valylleucyllysylprimaquine, (B) D-alanylleucyllysylprimaquine and (C) valylleucyllysylprimaquine.

The problem of the peptide prodrugs, in general, is their instability [139,140], and this also happens with peptide primaquine prodrugs. They are rapidly hydrolyzed to primaquine by aminopeptidases and endopeptidases [141,142]. This suggests an extensive hydrolysis in the intestinal lumen when the prodrugs are orally administered, therefore, more stable peptide derivatives were needed [146]. One example is the use of imidazolidin-4-one formation (Figure 23) to protect the *N*-terminal amino acid residue of di-tri- and penta peptides against aminopeptidases-catalyzed hydrolysis [143].

Figure 23. Chemical structures of imidazolin-4-one derivatives of primaquine.

R₁, R₂ and R₃ = (cyclo)alkyl or benzyl group

These primaquine prodrugs were synthesized as potential double prodrugs of primaquine and may be useful as slow-release forms of the parent amino acid derivatives. These compounds showed to be highly potent as gametocytocidal against *P. berghei* [144].

Vagapandu and co-workers [145] have used modified 8-aminoquinoline compounds with increased blood-schizontocidal activity and activity against drug-resistant strains. Attempts to improve the properties of 8-quinolinamine antimalarial agents through prodrug approach indicated, however, that a single chemical modification is not sufficient to achieve the desired alteration in the biological properties to enhance blood-schizontocidal activity [138]. Two series of “double prodrug” or “pro-prodrug” were therefore proposed (Figure 24). They need two independent reactions in order to regenerate the parent drug.

Figure 24. Pro-prodrug series of primaquine analogue ($R=C_5H_{11}$ or C_7H_{15}), and the regeneration of parent drug.

Pro-prodrug from series "A", where $R=C_5H_{11}$ or C_7H_{15} , and from series "B", where $R=C_5H_{11}$, have shown curative activity at initial test dosis of 100 mg/kg. The most potent compound of series "A", where $R=C_5H_{11}$ produced suppressive effects at the dose of 50 mg/kg, and was the most potent compound from the pro-prodrug series, leading to antimalarial activity comparable to its parent drug [145].

Pro-prodrugs, mutual prodrugs in the following examples, with statine-based inhibitor of protease plasmepsinII (PLMII) and primaquine peptide derivative have been linked by an alkyl diacid or an aromatic diacid (Figure 25) [146]. They have been designed based on the fact that inhibition of leads to starvation of the parasite. This enzyme is a potential target for antimalarial agents. The most active compound was 4,4'-oxybis(benzoic acid) and the primaquine derivative was leucyllsylprimaquine. Its IC_{50} was 0.59 nM in in vitro test against *P. falciparum* [147].

Figure 25. Primaquine-statine pro-prodrugs.

Prodrugs of dihydrotriazine

Malaria parasites have shown drug resistance for most of the antimalarials currently used. They include antifolate drugs such as cycloguanil, the active metabolite of proguanil (Figure 26).

Figure 26. Chemical structures of proguanil, cycloguanil, WR99210, phenoxypropoxybiguanides prodrugs and their active metabolites.

Mutations on the *P. falciparum* dihydrofolate reductase thymidilate synthase (*pf*DHFR-TS) enzyme lead to a decreased binding affinity for the drugs [148]. Rieckmann, in 1973 [149], demonstrated compound WR99210 to be potent *in vitro* against a CQ- and pyrimethamine-resistant strain of malaria and high level of efficacy against mutant *pf*DHFR-TS enzymes and antifolate resistant isolates of the malaria parasite [150]. Nevertheless, this interesting compound provokes significant gastrointestinal intolerance in animal studies and poor bioavailability.

Phenoxypropoxybiguanide prodrugs, including the prodrug of WR99210 (Figure 26), were then synthesized. They have similar metabolization to that of proguanil [151,152]. Shearer and co-workers [153] have studied these prodrugs and prove that the active dihydrotriazines metabolites exhibited IC_{50} values less than 0.04 ng/mL against the CQ/pyrimethamine-sensitive (D6) and CQ/pyrimethamine-resistant DHFR mutant strain (W2).

Prodrugs of protein farnesyltransferase inhibitors

Another potential target for the design of new antimalarial drugs is protein farnesyltransferase (PFT) [154]. PFT catalyzes the covalent transfer of a farnesyl group to cysteine residues near to the C-terminus of protein substrates. It displays a critical role in cellular signaling and other regulatory paths [155].

Ohkanda and co-workers [156] have tested a series of peptidomimetics PFT inhibitors against *P. falciparum* *in vitro*. In this study, compound FTI-2148 has no activity against *P. falciparum* ($ED_{50} > 30$ μ g/mL), despite being a potent mammalian PFT inhibitor ($IC_{50} = 1$ nM). On the other hand, the methyl ester prodrug of FTI-2148 (Figure 27) inhibited *P. falciparum* growth with an $ED_{50} = 2$ μ g/mL. Other prodrugs are depicted in Table I and resulted from further work of Carrico and co-workers [157]. Although not active in the *P. falciparum* PFT, they were able to cross biological barriers due to their higher hydrophobicity and membrane permeability when compared to the free acid. Not only the hydrophobicity may affect the delivery of the compound into the parasite cell. Other factors, such as size and conformation of the ester side chain also display a role in the activity.

Figure 27. Chemical structures of compound FTI-2148 and its methyl ester prodrug FTI-2153.

Table 1. Inhibition activity of FTI-2148 prodrugs against *P. falciparum* PFT and *P. falciparum* infected red blood cell

R	LogP	<i>P. falciparum</i> PFT IC ₅₀ (nM)	<i>P. falciparum</i> infected RBC ^a ED ₅₀ (nM)
CH ₃ (FTI-2153)	4.44	>1000	3300
C ₂ H ₅	4.88	750	1900
H ₂ C=CH-	5.19	>1000	1800
HC(CH ₃) ₂ -	5.19	>1000	800
H ₂ C(CH ₂) ₄ CH ₃	7.09	>1000	700
HC(C ₆ H ₁₁)-	4.94	>1000	350
H ₂ C(C ₆ H ₅)-	6.09	1000	150
H (FTI-2148)	1.77	15	>66,000

Prodrugs of pyrroloquinazolinediamine

Pyrroloquinazolinediamine (PQD) and its derivatives possess antimalarial among other activities [158]. They are very active antimalarial agents *in vivo* and *in vitro* [159-161], but are also highly toxic. Several prodrugs were prepared and two of these derivatives, tetraacetamido-pyrroloquinazolinediamine (PQD-A4) and *bis*-ethylcarbamyl pyrroloquinazolinediamine (PQD-BE), were more potent and less toxic than the parent compound (Figure 28) [162]. They show high *in vitro* activity against *P. falciparum*, with a IC₅₀=0.01 ng/mL, and against *P. berghei* in a rodent model, with a 100% curative oral dose between 0.1 and 4 µg/kg [162]. These two derivatives were also highly active in *Aotus* monkeys (oral curative doses, 1 mg/kg) and no toxicity was reported to the mammalian host. The high activity of PQD-A4 together with its high safety account for its interest as a promising candidate for antimalarial treatment [163].

Figure 28. Chemical structures of PQD, PQD-A4 and PQD-BE.

Prodrugs of aromatic amidine

Due to the potential interest of benzamidine groups found in many drugs, bezamidoxime and derivatives or carbamates are more lipophilic and less basic prodrugs with decreased pK_a, overcoming the low oral bioavailability of this group of compounds [164-168]. These modifications improved bioavailability up to 30-fold and oral activity by 20-fold [164,168,169] and reduced adverse effects [164,168], although little effect was seen on the half-life eliminations of these compounds [164]. The conversion of benzamidoxime groups to benzamidine, both *in vitro* and *in vivo*, is performed by a microsomal reductase system present in all mammalian species [170].

Ouattara and co-workers [171] have synthesized a series of prodrugs of the lead compound 1,12-bis(*N,N'*-acetamidinyl)dodecane (M64, Figure 29). These prodrugs were tested in mice infected with *P. vinckei* and were administered intraperitoneally and orally once daily for four consecutive days. Prodrug 2 was not very effective probably due to its low conversion to drug. Prodrugs 1 and 3 showed to be effective and prodrug 4 was even more potent by oral route with an activity at least 3 times higher than the parent drug M64 and the best after oral administration.

Figure 29. Chemical structures of compound M64 and its prodrugs. *CD-CS approach*

Cerami and co-workers [172] demonstrated that CS protein (malaria circumsporozoite) [173] found in the outer surfaces of sporozoites and responsible for the liver-specific invasion of malaria parasite could be used as a delivery vehicle to introduce recombinant DNA into hepatocytes. They used adenovirus as an endosomal lysing agent. On the other hand, Lin-Lee and co-workers [174] used nonviral vectors for the same purpose. They studied a receptor-mediated delivery strategy using recombinant fusion protein consisting of CS protein as a ligand and bacterial cytosine deaminase (CD). This enzyme catalyzes the production of 5-fluorouracil (5-FU) from its prodrug 5-fluorocytosine (5-FC) (Figure 30). Receptor for CS protein is distributed predominantly at the basolateral domain of hepatocytes [175]. This CD-CS system could be cell type-specific and in the presence of exogenous 5-FC would be prone to kill the parasites [174].

Figure 30. CD-CS approach. Conversion of 5-fluorocytosine (5-FC) into 5-fluorouracil (5-FU) by cytosine deaminase (CD).

Prodrugs for Schistosomiasis

Prodrugs of oxamniquine

With the purpose of obtaining new and better oxamniquine derivatives, polymeric prodrugs have been designed. Polymethacrylic and polyacrylic are known to anchor drugs, promoting improved bioavailability, prolonged action and reduced adverse effects. Thus, Parise Filho and co-workers [176] selected methacrylic and acrylic monomers as carriers and synthesized oxamniquine methacrylate, acrylamide and methacrylate copolymer (Figure 31).

Figure 31: Structures and hydrolysis of prodrugs of oxamniquine.

Preliminary *in vivo* evaluation showed that oxamniquine methacrylate and oxamniquine acrylamide have prolonged action profiles and reduced worm charge. Concerning parasite charge, similar profiles to oxamniquine were observed. Otherwise, for the compound oxamniquine methacrylate copolymer, a significant increase in the number of worms was observed, suggesting that the methacrylate copolymer did not exhibit antiparasitic activity. This behavior may be related to

several factors such as: the compound might not have achieved the effective dosis in the studied period; problems of drug release from the polymeric matrix, due to its complexity, and also to the high molecular weight of the prodrugs obtained, which may have inhibited the endocytosis process.

Almeida and co-workers synthesized an oxamniquine polymeric prodrug [177], using dextran T-70 (Figure 32) as a carrier, in order to improve the oxamniquine action and minimize its side effects. The preliminary tests of biological activity of this compound showed similar activity of the polymeric prodrug when compared to the commercial oxamniquine (Mansil®).

Based on the oxamniquine mechanism of action – enzyme esterification to a reactive ester that acts as an alkylating agent and binds covalently to schistosomal DNA -- El-Hamouly synthesized oxamniquine acetate (Figure 31) and studied the effect on the survival of hycanthone-sensitive and hycanthone-resistant strains of *S. mansoni* [178]. In addition, the effect on schistosome [³H]uridine incorporation was determined, since it has been shown that there is a good correlation between this effect and schistosomicidal activity. The prodrug inhibited [³H]uridine incorporation and caused death in the hycanthone-sensitive strain, but no effective in hycanthone-resistant strain.

Figure 32: Chemical structure of the dextran-methylcarboxylate prodrug of oxamniquine.

Prodrugs of dihydroartemisinin

Derivatives of artemisinin, which are already widely and effectively used in the treatment of malaria, also display antischistosomal properties [179]. Artesunate acts as a prodrug of dihydroartemisinin (DHA) is rapidly hydrolysed to DHA in presence of water (Figure 17). Utzinger and co-workers showed this prodrug is highly active against the juvenile stages of *S. mansoni*, whereas adult worms are considerably less susceptible [180]. Another study [181] lead to the conclusion that artesunate is more active than praziquantel in causing damage to the tegument of adult *S. mekongi*.

Further studies are needed to answer whether *S. mekongi* has the same typical stage specific susceptibilities to artesunate or artemether as previously observed in *S. mansoni* and *S. japonicum*.

Tuberculostatic prodrugs

Bioprecursors for tuberculosis chemotherapy

Several antituberculosis compounds are bioprecursor prodrugs that require activation by *Mycobacterium* enzymes to acquire bacterial toxicity (Figure 33). These include pyrazinamide (PZA), isoniazid (INH) and ethionamide (ETA). PZA is activated by the mycobacterial pyrazinamidase (PncA) to pyrazinoic acid, that lowers the pH enhancing the intracellular accumulation of the latter. This is unable to diffuse across the mycobacterial cell wall, leading to the disruption of membrane transport and energy depletion [182,183]. Because no pyrazinoic acid efflux mechanism exists, this accumulation process causes a remarkable susceptibility of *M. tuberculosis* to pyrazinamide. Mutations in the gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase (*pncA*), cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus [184]. Both isoniazid and the structurally analogous thioamide, ethionamide, act as inhibitors of InhA (enoyl-acyl carrier protein reductase). However, the large majority of isoniazid-resistant strains remain full susceptible to ethionamide [185]. This is due the fact that INH and ETA are activated by different mechanisms; thereby there is no cross-resistance [186,187].

Figure 33. Chemical structures of some antimycobacterial agents.

The INH is activated by the catalase/oxidase (KatG) [187;188], generating an isonicotinoyl radical, which then couples to NADH [189], giving an INH-NADH adduct, which is a potent inhibitor of InhA. Monooxygenase (EthA)-mediated conversion of ETA results in the formation of the corresponding sulfoxide product (Figure 34). This has to be activated in a subsequent reaction and the second activation step was also found to be catalyzed by EthA yielding 2-ethyl-4-amidopyridine as final product with no antitubercular activity [190]. This indicates that the key toxic species is formed as an unstable reactive product intermediate [186]. It has been suggested that the initial sulfinate

product formed after two consecutive EthA-mediated sulfoxidations of the parent drug decomposes to form a labile toxic intermediate [191]. Besides ethionamide, several others thioamide prodrugs and probably thiacetazone (TAZ) are activated by EthA. However, the final target for these antitubercular prodrugs differ for each one, although ethionamide and several others thioamide prodrugs but not TAZ affect the synthesis of short-chain fatty acids [186,190,192,193].

Figure 34. Activation pathway of the bioprecursors for tuberculosis and targets of the active compounds.

Oxidation of TAZ by EthA at basic pH favors formation of the carbodiimide, whereas neutral or acidic conditions lead to the sulfinic acid. These metabolites derive from an initial sulfenic acid

intermediate. The sulfenic acid and carbodiimide metabolites, but not the sulfinic acid product, readily react with glutathione. These reactions may be involved in the antitubercular activity of TAZ (Figure 34) [194].

Mutual prodrug of isoniazid, para-aminosalicylic acid, and ethambutol

Antitubercular therapy is given for a long time and involves combination of drugs as 4-amino-salicylic acid (PAS), isoniazid (INH), ethambutol (EB) along with rifampicin, which is marketed in combination dosage form.

The free acid carboxylic group in PAS accounts for its gastrointestinal irritation effects. This drug is extensively metabolized by acetylation of the amino group and conjugation with glucuronic acid and glycine at the carbonyl group. Since its half-life for the metabolism is one hour, large doses are needed to maintain a minimum effective level of the PAS. INH is readily absorbed on oral administration, extensively metabolized to inactive metabolites (diacetylhydrazide, acetylhydrazide, *N*-acetylisoniazid and hydrazine) [195] and when co-administered with PAS, this drug is found to reduce its acetylation increasing its plasma level

EB is a water-soluble, bacteriostatic agent which is readily absorbed (75–80%) following oral administration. Most of the administered EB is excreted unchanged, with not more than 50% appearing in urine in oxidized form of aldehyde or carboxylic acid [196,197]. Since this drug can be used in combination with PAS and INH, Rawat and co-workers synthesized mutual prodrugs. The objectives were the reduction of gastrointestinal toxicity of PAS; the reduction of intestinal acetylation of isoniazid and the increase in duration of action, besides decreasing the dose of drugs (Figure 35) [198].

Figure 35. Chemical structures of the mutual prodrugs (PAS = *para*-aminosalicylic acid; INH = isoniazid; EB = ethambutol).

Those mutual prodrugs were absorbed unhydrolyzed. *In vivo* studies were also performed to confirm the release profile of these prodrugs and greater serum concentrations of EB, PAS and INH than their concentrations when given alone were found. Therefore, those mutual prodrugs eliminate significantly the problem of catabolism by acetylation in gastrointestinal tract and also PAS and INH toxicity [198].

Prodrugs of nitroimidazoles

One-third of the world population is currently infected with latent TB associated with the presence of the latent, non-replicating and resistant to conventional antimycobacterium drugs forms of the bacterium [199,200]. The latent bacilli have adapted to anaerobiosis and can maintain viability for extended periods of time. The first compound to show selective activity against those forms of *M. tuberculosis* was metronidazole. It undergoes reduction of its nitro group to reactive species that causes DNA damage and subsequent cell death [201]. However, metronidazole failed to show activity in an *in vivo* mouse model [202].

Based on the activity of nitroimidazoles, a series of 6-substituted-2-nitroimidazo[2,1-*b*][1,3]oxazimes prodrugs (Figure 36) were synthesized, which require bioreductive activation of an aromatic nitro group to exert antitubercular effects. PA-284 showed significant antitubercular activity against sensitive, mono-resistant and multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis*, as well as against latent bacilli. It was also active against *M. tuberculosis* in *in vivo* mouse models [203]. This prodrug is in phase I clinical trials sponsored by the Global Alliance. However, *M. tuberculosis* mutant relatively to a specific protein, a F₄₂₀-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase, that metabolizes PA-824 and also CGI17341, showed to be resistant those compounds [204;205].

Figure 36. Chemical structures of nitroimidazole prodrugs.

Compounds NLCQ-1 and NLCQ-2 hydrochloride (Figure 36) were tested against dormant *M. tuberculosis* H₃₇Rv [204]. Both compounds demonstrated significant activity, comparable with PA-824. They showed Minimal bactericidal concentrations (MBCs) of 3.1–18.4 and 4.9–9.8 µg/mL, respectively while PA-824 MBC was 6.4–12.8 µg/mL. These compounds, mainly NLCQ-1 are

activated by different reductive enzymes (cytochrome P450 reductase and cytochrome B₅ reductase) and therefore resistance to those prodrugs does not appear in *M. tuberculosis* H₃₇Rv mutant [205,206].

Nucleoside analogues prodrugs

Co-infection of AIDS with TB is now the leading cause of death for one out of three people who die with the former. For this very reason, an ideal drug for HIV/AIDS patients should have anti HIV activity while treating TB [207-209].

Shriram and co-workers developed and evaluated mutual prodrugs composed of an antimycobacterial agent, as ciprofloxacin, norfloxacin and isoniazid, and a anti HIV nucleoside analogues, as zidovudine, stavudine and lamivudine [209-212].

Figure 37. Ester prodrugs of zidovudine.

Mutual prodrugs of zidovudine (Figure 37) with INH, ciprofloxacin and norfloxacin were tested against *M. tuberculosis* strain H₃₇Rv at a single concentration, 6.25 µg/mL. The prodrugs bearing ciprofloxacin or norfloxacin were the most active, showing 99% inhibition while isoniazid containing prodrug showed 90% inhibition [213]. Prodrugs of stavudine containing a fluoroquinolone moiety (Figure 38) showed 100% inhibition, while INH containing prodrug presented 90% inhibition [210]. Lamivudine prodrugs with fluoroquinolones (Figure 39) showed 92–100% inhibition against H₃₇Rv *M. tuberculosis* strains [213].

Figure 38. Ester prodrugs of stavudine. **Figure 39.** Prodrugs of lamivudine.

The stability for these mutual prodrugs concerning the transport across the cell membrane and their intracellular reversion to the parent compound, especially in the virally infected cells, display a determinant role in their interest as antituberculous agents in co-infection TB and HIV. Those prodrugs were hydrolyzed in the range of 20 to 240 min, and 120 to 240 for lamivudine prodrugs. The lamivudine prodrug C (Figure 39) inhibited HIV-1 replication and was responsible for 100% inhibition of *M. tuberculosis* and those properties account for its effective treatment of HIV/AIDS co-infection [213].

Polymeric prodrugs of norfloxacin

Mycobacteria are facultative intracellular pathogens and escape killing during phagocytosis by blocking phagosome-lysosome fusion. Intracellular mycobacteria are also largely protected against drugs and in this condition, they are difficult to be destroyed [214].

To be effective against intracellular bacteria, the drugs must penetrate the cells. Drug delivery systems capable of specifically targeting the drug into the macrophages can help to face this challenge [215]. Drugs linked to a homing device, that interact with a specific cell receptor, through a macromolecular carrier could induce the endocytosis of the drug, improving its effectiveness and imparting a selective action. Mannosyl ligands are director groups that can be used to target macrophages [216].

Covalent linking of norfloxacin to a polymeric carrier is one approach to improve its pharmacological properties (Figure 40). The prodrug is uptaken by cells, enters through endocytosis, and since the conjugate is large enough to impair renal filtration, the drug delivery and consequently its effectiveness are improved [217-219].

Figure 40. Schematic representation of the polymeric prodrugs and the product of enzymatic hydrolysis activity. A and B, norfloxacin linked through amide bond and C and D, norfloxacin linked through an α bond.

In this example, two different peptide spacer arms, Gly-Phe-Ala-Leu and Gly-Phe-Gly-Gly were used to link norfloxacin to dextran. In the former, Leu-norfloxacin was released in the presence of the lysosomal enzyme cathepsin B, instead of free norfloxacin. On the other hand, more than 60% of norfloxacin was released at pH 5.5 in presence of cathepsin B if the peptide was Gly-Phe-Gly-Gly (α -norfloxacin)-O-methyl linked to dextran with or without mannose [217]. The first conjugate is 20 times less active than the other conjugate, when tested *in vitro* against *M. bovis* BCG. The test in mice infected with *M. bovis* BCG prove that only the conjugate containing both an α bond and mannose was as active as isoniazid. This conjugate was able to deliver norfloxacin directly into macrophages and controls micobacterial growth in the liver, where isoniazid is inactive due to the low pO_2 , which turns *M. tuberculosis* insensitive to isoniazid and rifampicin [220].

Polymeric prodrug of isoniazid and pyrazinamide

Micellar systems of polyethyleneglycol-poly(aspartic acid) copolymer were used by Silva and co-workers [221] as carrier to the tuberculostatic drug isoniazid, which was covalently bounded to the system (Figure 41A).

Figure 41. Micelles of PEG-PAS covalently linked to drugs. A. isoniazide; B: pyrazinamide.

This polymeric prodrug envisioned not only the prolonged delivery of the drug, but also the lowering of toxicity and extension of the period between two consecutive doses, so patients would be more willing to follow the treatment schedule.

Later on, the same group extended their work to another antitubercular polymeric prodrug, derived from a poly(ethyleneglycol)-poly(aspartic acid) block copolymer by substituting pyrazinamide on the aspartate free carboxylic groups (PEG-PASP-PZA) (Figure 41B) [222]. The substituted polymer forms a micelle, with a hydrophobic core consisting of the drug-ligand group and a hydrophilic outer coat [221,222].

The advantage of this micellar carrier over others lies in the ability to control the particle size, its structural stability and good solubility in water. In addition, this structure allows a controlled rate of delivery of the drug, reduced toxicity and selective action on the chosen target [223,224]. The potential for prolonged drug action at low toxicity level means that this system could lead to greater patient approval. This micelle-forming polymeric prodrug offers the advantages of reducing toxicity and immunogenicity.

The activity of pyrazinamide is pH-dependent and is limited to slow-growing bacilli. Owing to its toxic effect on the liver, it has to be used under closed medical supervision, accompanied by regular tests of liver function. Thereby, this polymeric prodrug can be very useful to reduce pyrazinamide toxicity to the liver. Furthermore, the PEG-PASP-PZA derivative, when assayed for its anti-*Mycobacterium* activity, exhibited stronger activity than the simple drug [222].

In 2004, Rando and co-workers [225] used *N*-methylene phosphonic chitosan (NMPC) to obtain a polymeric prodrug of isoniazid, defined as chitosan-isoniazid hemisuccinate. This polymeric system aimed, not only to slow the drug delivery as proposed by Silva and co-workers [221,222], but also to obtain a specific action (Figure 42).

Figure 42. Chitosan-Isoniazid hemisuccinate.

Generally, chitosan is a largely used carrier because of the presence of free NH₂ group that provides a reactional center either to modification or drug linkage [225]. This derivative is almost atoxic and has immunopotentiating effect by stimulating macrophages and increasing the humoral response [226]. Since the macrophages are the host cell of *M. tuberculosis*, prodrugs with chitosan as carrier could act as a targeted prodrug.

The *N*-methylene phosphonic group account for the higher hydrosolubility of the resulting prodrug which can be easily handled and intravenously administrated [227].

DA-7218 prodrugs

Oxazolidinones are a new, unique class of synthetic antibacterial agents effective against many gram-positive bacteria, including aerobic pathogenic actinomycetes of the genera *Mycobacterium*, *Nocardia*, and *Actinomadura* [228-232]. Linesolid (Figure 43) was the first oxazolidinone introduced in the market. It was active in animal models and also in clinical trials with patients infected with *M. tuberculosis* [233]. Oxazolidinones selectively inhibit bacterial protein synthesis by avoiding the formation of a functional 70S initiation complex [234]. DA-7157 was shown to be more active than linesolid in *in vitro* test against several gram-positive species [235].

Figure 43. Chemical structures of oxazolidinone derivatives.

This compound is generated by the metabolism of DA-7218, a highly hydrophilic prodrug (Figure 43). Both compounds were tested against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, their MIC_{90s} against *M. tuberculosis* was about 0.5 µg/mL [235]. DA-7218 is an excellent candidate to be used in humans, although the *in vivo* test has not been performed yet. It has good water solubility, which allows high availability and perfusion in the tissues.

Prodrugs for Sickle Cell Disease

Butyric acid prodrugs

Recently, butyric acid (BA) and derivatives [236-238] were proposed to be useful in the treatment of β -globin disorders such as sickle cell disease and β -thalassemia. Their effect is associated with an increase in HbF production that leads to the minimization of the clinical symptoms of this disease [239]. However, BA is poorly absorbed in human gastrointestinal tract. In order to solve this problem, a series of butyric acid prodrugs were designed [238]. BA prodrugs, which also display low toxicity, may have significant advantages for the treatment of β -thalassemia and sickle cell anemia, when compared to the cytotoxic agent hydroxyurea approved for the chronic treatment of the latter [240].

BA possesses a carboxylic acid function and there are suitable prodrugs for this functional group [9]. Esterification of BA improves its permeability across cell membranes and imparts this acidic compound with an efficient delivery to a subcellular target. Therefore, a series of acyloxyalkyl esters prodrugs designed with the aim of increasing stability and lipophilicity [238] was designed. Those compounds release equimolar amounts of BA, an aldehyde and a second acid. This is mainly biologically inactive and acts as “carrier” moieties. An example of this strategy was the compound AN-9 (Pivanex[®]) that after metabolic hydrolysis releases one molecule of butyric acid and fragments of carrier represented by pivalic acid and formaldehyde (Figure 44).

Figure 44. Metabolic hydrolysis of Pivanex[®].

The most active prodrug was the butylidene dibutyrate (AN-10), that releases 2 equivalents of BA and 1 of butyraldehyde. This undergoes further *in vivo* oxidation to BA (**Fig 45**).

Figure 45. Metabolic hydrolysis of AN-10.

ribonucleotides into deoxyribonucleotides (dNTPs), involved in DNA synthesis and repair [247,248]. It increases the level of fetal hemoglobin (HbF), a genetically distinct hemoglobin (Hb) that inhibits the polymerization of deoxygenated sickle cell hemoglobin [249,250]. HU display other mechanism of action [249,251,252], being also considered as a source of nitric oxide (NO). This plays an important role in the maintenance of normal blood pressure and flow, and has drawn considerable interest as a sickle cell disease treatment.

Hydroxyurea could be consider a bioprecursor prodrug because after its oxidation, it may decompose into NO, ammonia and formamide or carbon dioxide, depending on the conditions and type of oxidant (Figure 48).

Figure 48: Hydroxyurea oxidation to nitric oxide (NO).

Nitrate derivatives

Nitrate organic compounds have vasodilatador acivity and are effective against stable angina. They could be metabolized into nitric oxide (NO) through bioactivation catalyzed by various enzymes such as glutathione S-transferase, cytochrome P-450, and possibly esterases [253]. Since NO is unstable, the prodrug approach can solve this problem, through more stable NO-donors, as nitrate prodrugs. The compounds NO-donors have vasodilatation and plalet aggregation inhibition activities among others [254].

Recently nitrate prodrugs with NO-donor properties were developed in our laboratory. These compounds increased gama-globin expression in K562 cell culture and presented important analgesic and anti-inflammatory activity that could be useful to the treatment of the SCD [255].

Conclusions

Prodrug approaches are interesting and promising alternatives to solve problems presented by current drugs or also by those that are under development. We have shown valuable examples of their use as a molecular modification tool to improve mainly pharmacokinetics properties of existing drugs, or also to experimental compounds, for the treatment of some neglected diseases.

Although many examples have been presented herein, prodrug design could be more explored by researchers in order to minimize the lack of suitable chemotherapeutic agents for the diseases considered in this review. It is worth noting that improving drug properties can, generally, lead to better alternatives associated with low cost and less time-consuming processess. These characteristics are of utmost importance for drug development mainly considering people affected by the neglected diseases, their needs and also the limited interest of pharmaceutical companies due to the low profit involved.

Acknowledgements

We wish thank to thank our funding agencies, FAPESP; CNPq, CAPES, PADCF/FCF; FINEP; FUNDUNESP, for financial support.

List of abbreviations used

5-FC: 5-fluorocytosine

5-FU: 5-fluorouracil

ADEPT: antibody-directed enzyme prodrug therapy

AN-10: butylidene dibutyrate

apoL-I: apolipoprotein L1

BA: butyric acid

CD-CS: recombinant fusion protein consisting of CS protein as a ligand and bacterial CD: cytosine deaminase

CL: cutaneous leishmaniasis

CMD-P: carboxymethyldextran-thiomannopyranoside-pyrimethamine

CpG ODN: CpG oligodeoxynucleotides

CpG: a dinucleotide constituted by a cytosine followed by guanine separated by a phosphate

CQ: chloroquine

CS: malaria circunsporozoite

DFMO: eflornithine

DHA: dihydroartemisinin

DHFR: dihydrofolate reductase

DHFR-TS: dihydrofolate reductase thymidilate synthase

dNTPs: deoxyribonucleotides

DOXP: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate

EB: ethambutol

ETA: ethionamide

EthA: a flavin monooxygenase found to catalyze the Baeyer-Villiger reaction

Et-NIPOx: ethyl ester of *N*-isopropyl oxamate

fma: 2-(*N*-formyl-*N*-methyl)aminoethyl

GI: gastrointestinal

GR: glutathione reductase

GSH: glutathione

HADH-isozyme: α -hydroxyacid dehydrogenase-isozyme

HAT: Human African Trypanosomiasis

Hb: hemoglobin

Hb F: fetal hemoglobin

Hb S: hemoglobin S

HU: hydroxyurea

INH: isoniazid

InhA: enoyl-acyl carrier protein reductase

KatG: catalase/oxidase

LDH-C4: lactate dehydrogenase isozyme-x

mAb: monoclonal-antibody

mAb-drug: monoclonal-antibody drug conjugate

MBCs: minimal bactericidal concentrations

NbAn33: a mAb specific for the conserved carbohydrate epitope of VSGs

NF: nitrofurazone

NFOH: nitrofurazone hydroxymethyl derivative

NHS: normal human serum

NIPOx: *N*-isopropyl oxamate

NMPC: *N*-methylene phosphonic chitosan

OEC: oxygen equilibrium curve

PAS: 4-aminosalicylic acid

PEG-PAS polyethyleneglycol-poly(aspartic acid)

PEG-PASP-PZA: poly(ethyleneglycol)-poly(aspartic acid) block copolymer by substituting pyrazinamide on the aspartate free carboxylic groups

***pf*DHFR-TS**: *P. falciparum* dihydrofolate reductase thymidilate synthase

PFT: protein farnesyltransferase

PLMII: plasmepsinII

PncA: mycobacterial pyrazinamidase

PQ: primaquine

PQD: pyrroloquinazolinediamine

PQD-A4: tetra-acetamido pyrroloquinazolinediamine

PQD-BE: *bis*-ethylcarbonyl pyrroloquinazolinediamine

Pro-D ODN: a prodrug form of CpG ODN type D

Pro-D35: D-35 prodrug

PTR1: pteridine reductase enzyme

PZA: pyrazinamide

SCD: sickle cell disease

SD-P: succinyl-dextran-thiomannopyranoside-pyrimethamine

SRA: serum resistance-associated

SS cells: sickle erythrocytes

TAZ: thiacetazone

TB: tuberculosis

TLR-9: Toll-like receptor 9

Tr-apoL-I: truncated apoL-I

VL: visceral leishmaniasis

VSG: variant surface glycoprotein

References and Notes

1. Hotez, P.J.; Molyneux, D.H.; Fenwick, A.; Ottesen, E.; Ehrlich, S.S.; Sachs, J.D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria, *PLoS Med.* **2006**, *3*, e102.
2. Beyrer, C.; Villar, J.D.; Suwanvanichkij, V.; Singh, S.; Baral S.D.; Mills, E.J. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. *Lancet* **2007**, *370*, 619–627.
3. Trouiller, P.; Olliaro, P.; Torreele, E.; Orbinski, J.; Laing, R.; Ford, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet* **2002**, *359*, 2188–2194.
4. Ehrenberg, J.P.; Ault, S.K. Neglected diseases of neglected populations: thinking to reshape the determinants of health in Latin America and the Caribbean, *BMC Public Health* **2005**, *5*, 119–132.
5. Medecins Sans Frontieres. *Drugs for Neglected Diseases Initiative: Teaming up to address neglect* (12 March, 2003). Accessed from www.accessmed.msf.org in Nov. 2007.
6. Pécou, B. New drugs for neglected diseases: from pipeline to patients. *PloS Med.* **2004**, *1*, 19–22.
7. Pink, R.; Hudson, A.; Mouriès, M.A.; Bendig, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Rev. Drug Disc.* **2005**, *4*, 727–740.
8. Lee, H. J.; Cooperwood, J. S.; You, Z.; Ko, D. H.. Prodrug and antedrug: two diametrical approaches in designing safer drugs. *Arch. Pharm. Res.* **2002**, *25*, 111–136.
9. Silva, A.T.A.; Castro, L.F.; Guido, R.V.C.; Chung, M. C.; Ferreira, E.I. Advances in prodrug design. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 893–914.
10. Brener, Z. A descoberta. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1989**, *84* (supl II), 1–6.
11. World Health Organization. *Chagas Disease: TDR* Accessed from <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/> in Dec. 2007.
12. Urbina JA. Parasitological cure of Chagas disease: Is it possible? Is it relevant? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **1999**, *94*, 349–355.
13. Rodrigues-Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **2002**, *97*, 3–24.
14. Urbaniak, M.D.; Tabudravu, J.N.; Msaki, A.; Matera, K.M.; Brenk, R.; Jaspars, M.; Ferguson, M.A.J. Identification of novel inhibitors of UDP-Glc 40-epimerase, a validated drug target for african sleeping sickness. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5744–5747.
15. Nkemngu, N.J.; Grande, R.; Hansell, E.; McKerrow, J.H.; Caffrey, C.R.; Steverding, D. Improved trypanocidal activities of cathepsin L inhibitors. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2003**, *22*, 155–159.
16. Kuzoe FAS, Perspectives in research on and control of African trypanosomiasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1991**, *85*, 33–41.
17. Barrett M.P. The fall and rise of sleeping sickness. *Lancet* **1999**, *353*, 1113–1114.
18. World Health Organization. *Strategic Direction for Research: Leishmaniasis*, **2002**.

19. Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.* **2004**, *27*, 305–318.
20. Szyniarowski, P.; Bettendorff, L.; Schweingruber, M.E. The antitrypanosomal drug melarsoprol competitively inhibits thiamin uptake in mouse neuroblastoma cells. *Cell Biol. Toxicol.* **2006**, *22*, 183–187.
21. WHO. *The world health report 2004. Changing history*. WHO: Geneva, **2004**; <http://www.who.int/whr/2004/en/index.html> (accessed June 12, 2007).
22. Herwaldt, B. L. Miltefosine: The long-awaited therapy for visceral leishmaniasis? *N. Engl. J. Med.* **1999**, *341*, 1840–1842.
23. Berman, J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2003**, *16*, 397–401.
24. Croft, S.L.; Coombs, G.H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 502–508.
25. Davis, A.J.; Murray, H.W.; Handman, E. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *Trends Parasitol.* **2004**, *20*, 73–76.
26. Ouellette, M.; Drummelsmith, J.; Papadopoulou, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.* **2004**, *7*, 257–266.
27. World Health Organization. *Global Malaria Programme: Epidemics and Emergences*. <http://www.who.int/malaria/epidemicsandemergencies.html>. Accessed in December 2007.
28. Biot, C.; Chibale, K. Novel Approaches to Antimalarial Drug Discovery. *Infect. Disord. Drug Targets* **2006**, *6*, 173–204.
29. Menezes, C.M.S.; Ferreira, E.I. Modulating agents in resistant malaria. *Drug Design Rev. Online* **2005**, *2*, 409–418.
30. World Health Organization. *Report of the third global meeting of the partners for parasite control Deworming for Health and Development*, **2005**. <http://www.who.int/wormcontrol> Accessed in Dec. **2007**.
31. Ribeiro-dos-Santos, G.; Verjovski-Almeida, S.; Leite, L.C.C. Schistosomiasis—a century searching for chemotherapeutic drugs. *Parasitol. Res.* **2006**, *99*, 505–521.
32. Murray, J. F. A century of tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2004**, *169*, 1181–1186.
33. World Health Organization. *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report* **2007**.
34. Bower, D. L.; Lane, H. C.; Fauci, A. S. Immunopathogenesis of the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* **1985**, *103*, 704–709.
35. Reider, H. L.; Cauthen, G. M.; Comstock, G. W.; Snider, D. E. Jr. Epidemiology of tuberculosis in the United States. *Epidemiol. Rev.* **1989**, *11*, 79–98.
36. Cardoso, E. M. Multiple drug resistance: a threat for tuberculosis control. *Rev. Panam. Salud Publica* **2004**, *16*, 68–73.
37. Elliott, L.; Ashley-Koch, A. E.; De Castro, L.; Jonassaint, J.; Price, J.; Ataga, K. I.; Levesque, M.C.; Weinberg, J.B.; Eckman, J.R.; Orringer, E.P.; Vance, J.M.; Telen, M.J. Genetic polymorphisms associated with priapism in sickle cell disease. *Br. J. Haematol.* **2007**, *137*, 262–267.

38. Hebbel, R.P. Special issue of microcirculation: Examination of the vascular pathobiology of sickle cell anemia. *Microcirculation* **2004**, *11*, 99–100.
39. Hiran, S. Multiorgan dysfunction syndrome in sickle cell disease. *J. Assoc. Physicians India* **2005**, *53*, 19–22.
40. Buchanan, G.R.; Debaun, M.R.; Quinn, C.T.; Steinberg, M.H. Sickle cell disease. *Hematology* **2004**, *1*, 35–47.
41. Stuart, M.J.; Nagel, R.L. Sickle-cell disease. *Lancet* **2004**, *364*, 1343–1360.
42. Perrine, S.P.; Ginder, G.D.; Faller, D.V.; Dover, G.H.; Ikuta, T.; Witkowska, H.E.; Cai, S.P.; Vichinsky, E.; Olivieri, N.F. A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the beta-globin disorders. *N. Engl. J. Med.* **1993**, *328*, 81–86.
43. Platt, O.S.; Brambilla, D.J.; Rosse, W.F.; Milner, P.F.; Castro, O.; Steinberg, M.H.; Klug, P.P. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *330*, 1639–1644.
44. Powars, D.R.; Weiss, J.N.; Chan, L.S.; Schroeder, W.A. Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity on sickle cell anaemia? *Blood* **1983**, *63*, 921–926.
45. Chung, M-C.; Silva, A. T de A.; Castro, L. F.; Guido, R. V C.; Nassute, J. C.; Ferreira, E. I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm/Braz. J. Pharm Sci.* **2005**, *41*, 155–179.
46. McKerrow, J.H.; McGrath, M.E.; Engel, J.C. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. *Parasitol. Today*, **1995**, *11*, 272–82.
47. Schirmer, R. H.; Müller, J. G.; Krauth-Siegel, L. Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: The design of drugs for trypanosomiasis and malaria. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 141–154.
48. Chung, M-C.; Gonçalves, M. F.; Colli, W.; Ferreira, E. I.; Miranda, M. T. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic dipeptide prodrugs of primaquine. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 1127–1131.
49. Bundgaard, H., Ed. *Prodrug Design*; Elsevier: Amsterdam, **1985**.
50. Chung, M. C.; Guido, R.V.; Martinelli, T. F.; Goncalves, 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. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 4779–4783.
51. Trossini, G. H. G.; Ferreira, E. I. ; Menezes, C. M. S. A substrate-specificity evaluation of cruzain by the AM1 semi-empirical method. In: *The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies - PACIFICHEM 2005, Honolulu, 2005: The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies - PACIFICHEM 2005, Abstract Book*, **2005**.
52. Menezes, C. M. S.; Trossini, G. H. G.; Chung, Mc ; Ferreira, E. I. A semi-empirical evaluation of mutual dipeptide prodrugs of primaquine and nitrofurazone toward antichagasic leads. In: *Molecular helminthology & drugs against protozoan parasites. Keystone Symposia - Drugs Against Protozoan Parasites: Target Selection, Structural Biology and Medicinal Chemistry, Silverthorne, 2005*.

53. Scalea, M. A. L.; Juliao, M. S. S.; Chung, M. C.; Serrano, S. H. P.; Ferreira, E. I. Voltammetric behavior of nitrofurazone and its hydroxymethyl prodrug with potential anti-Chagas' activity. *J. Braz. Chem Soc.* **2005**, *16*, 774–782.
54. Gerez de Burgos, N.M.; Burgos, C.; Blanco, A.; Paulone, I.; Segura, E.L. Actividad hidroxiaácido-dehidrogenasa en *Trypanosoma cruzi*. *Acta. Physiol. Latinoam.* **1976**, *26*, 10–19.
55. Coronel, C.; Gerez de Burgos, N.M.; Burgos, C.; Blanco, A. Separación y propiedades catalíticas de las iso enzimas de la α -hidroxiaácido deshidrogenasa de *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* **1980**, *40*, 159–164.
56. Coronel, C.E.; Rovai, L.E.; Gerez de Burgos, N.M.; Burgos, C.; Blanco, A. Properties of α -hydroxyacid dehydrogenase isozymes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1981**, *4*, 29–38.
57. Montamat, E.E.; Arauzo, S.S.; Blanco, A. Subcellular localization of leucine aminotransferase and α -hydroxiacid dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1987**, *22*, 185–193.
58. Elizondo, S.; Chena, M.A.; Rodríguez-Páez, L.; Noguera, B.; Baeza, I.; Wong, C. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* α -Hydroxyacid Dehydrogenase-isozyme II by N-Isopropyl Oxamate and its Effect on Intact Epimastigotes. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2003**, *18*, 265–271.
59. Aldunate, J.; Repetto, Y.; Letelier, M.E.; Morello, A. The carboxyl esterases of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.* **1987**, *86*, 67–71.
60. Chena, M.A.; Elizondo, S.; Rodríguez-Páez, L.; Noguera, B.; Baeza, I.; Wong, C. Trypanocidal activity of N-isopropyl oxamate on cultured epimastigotes and murine trypanosomiasis using different *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2005**, *2*, 189–197.
61. Brener, Z. Recent advances in the chemotherapy of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **1984**, *79*, 149–155.
62. Lanteri, C. A.; Trumppower, B. L.; Tidwell, R. R.; Meshnick, S. R. DB75, a novel trypanocidal agent, disrupts mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **2004**, *48*, 3968–3974.
63. Dann, O.; Fick, H.; Pietzner, B.; Walkenhorst, E.; Fernbach, R.; Zeh, D. Trypanocidal diamidine with three isolated ring systems. *Justus Liebig. Ann. Chem.* **1975**, 160–194.
64. Das, B. P.; Boykin, D. W. Synthesis and antiprotozoal activity of 2,5-bis(4-guanylphenyl)furans. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 531–536.
65. Syrigos, K. N.; Epenetos, A. A. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review of the experimental and clinical considerations. *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 605–614.
66. Pratt, R. F.; Faraci, W. S. Direct observation by proton NMR of cephalosporoate intermediates in aqueous solution during the hydrazinolysis and β -lactamase-catalyzed hydrolysis of cephalosporins with 3' leaving groups: kinetics and equilibria of the 3' elimination reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5328–5333.
67. Nguyen, V. K.; Desmyter, A.; Muyldermans, S. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv. Immunol.* **2001**, *79*, 261–296.

68. Lauwereys, M.; Arbabi, Ghahroudi, M.; Desmyter, A.; Kinne, J.; Holzer, W.; De Genst, E.; Wyns, L.; Muyldermans, S. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J.* **1998**, *17*, 3512–3520.
69. Stijlemans, B.; Conrath, K.; Cortez-Retamozo, V.; Xong, H. V.; Wyns, L.; Senter, P.; Revets, H.; De Baetselier, P.; Muyldermans, S.; Magez, S. Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by a single domain antibodies. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 1256–1261.
70. Hamers-Casterman, C.; Atarhouch, T.; Muyldermans, S.; Robison, G.; Hamers, C.; Songa, E. B.; Bendahman, N.; Hamers, R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* **1993**, *363*, 446–448.
71. Van Meirvenne, N.; Maginus, E.; Janssens, P. G. The effect of normal human serum on trypanosomes of distinct antigenic type (ETat 1 to 12) isolated from a strain of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **1976**, *56*, 55–63.
72. Vanhamme, L.; Pays, E. The trypanosome lytic factor of human serum and the molecular basis of sleeping sickness. *Int. J. Parasitol.* **2004**, *34*, 887–898.
73. Vanhamme, L.; Paturiaux-Hanocq, F.; Poelvoorde, P.; Nolan, D. P.; Lins, L.; Abbeele, J. V. D.; Pays, A.; Tebabi, P.; Xong, H. V.; Jacquet, A.; Moguilevsky, N.; Dieu, M.; Kane, J. P.; De Baetselier, P.; Brasseur, R.; Pays, E. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* **2003**, *422*, 83–87.
74. Xong, H. V.; Vanhamme, L.; Chamekh, M.; Chimfwembe, C. E. A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell.* **1998**, *95*, 839–846.
75. Baral, T. N.; Magez, S.; Stijlemans, B.; Conrath, K.; Vanhollebeke, B.; Pays, E.; Muyldermans, S.; De Baetselier, P. Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated Human Trypanolytic Factor. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 580–584.
76. Pays, E.; Vanhamme, L.; Perez-Morga, D. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 369–374.
77. Horn, D. The molecular control of antigenic variation in *Trypanosoma brucei*. *Curr. Mol. Med.* **2004**, *4*, 563–576.
78. D'Silva, C.; Daunes, S. Structure-Activity Study on the in Vitro Antiprotozoal Activity of Glutathione Derivatives. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2072–2078.
79. Krieg, A. M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 471–484.
80. Klinman, D. M.; Verthelyi, D.; Takeshita, F.; Ishii, K. J. Immune recognition of foreign DNA: a cure for bioterrorism? *Immunity*, **1999**, *11*, 123–129.
81. Klinman, D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 249–258.
82. Agrawal, S.; Kandimalla, E. R. Antisense and siRNA as agonists to Toll-like receptors. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1533–1537.
83. Grajkowski, A.; Pedras-Vasconcelos, J.; Wang, V.; Ausín, C.; Hess, S.; Verthelvi, D.; Beaucage, S. L. Thermolytic CpG-containing DNA oligonucleotides as potential immunotherapeutic prodrugs. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3550–3560.

84. Verthelyi, D.; Ishii, K. J.; Gursel, M.; Takeshita, F.; Klinman, D. M. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 2372–2377.
85. Verthelyi, D.; Kenney, R. T.; Seder, R. A.; Gam, A. A.; Friedag, B.; Klinman, D. M. CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 1659–1663.
86. Verthelyi, D.; Gursel, M.; Kenney, R. T.; Lifson, J. D.; Shuying, L.; Mican, J.; Klinman, D. M. CpG Oligodeoxynucleotides protect normal and SIV infected macaques from *Leishmania* infection. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 4717–4723.
87. Guiducci, C.; Ott, G.; Chan, J. H.; Damon, E.; Calacsan, C.; Matray, T.; Lee, K. D.; Coffman, R. L.; Barrat, F. J. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 1999–2008.
88. Wu, C. C. N.; Lee, J.; Raz, E.; Corr, M.; Carson, D. Necessity of oligonucleotide aggregation for Toll-like receptor 9 activation. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33071–33078.
89. Kerkmann, M.; Costa, L. T.; Richter, C.; Rothenfusser, S.; Battiany, J.; Hornung, V.; Johnson, J.; Englert, S.; Ketterer, T.; Heckl, W.; Thalhammer, S.; Endres, S.; Hartmann, G. Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon- α induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8086–8093.
90. Puig, M.; Grajkowski, A.; Bockowska, M.; Ausín, C.; Beaucage, S. L.; Verthelvi, D. Use of thermolytic protective groups to prevent G-tetrad formation in CpG ODN type D: structural studies and immunomodulatory activity in primates. *Nucleic Acid Res.* **2006**, *34*, 6488–6495.
91. Mansour, N. S.; Mcconnel, E. Leishmaniasis in the Sudan Republic 27. Lack of effect of chloroquine and pyrimethamine on visceral Leishmaniasis in the hamster. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1966**, *15*, 146–148.
92. Bello, A. R.; Nare, B.; Freedman, D.; Hardy, L.; Beverley, S. M. PTR1: A reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, *9*, 11442–11446.
93. Nare, B.; Hardy, L. W.; Beverley, S. M. The roles of pteridine reductase 1 and dihydrofolate reductasethymidylate synthase in pteridine metabolism in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 13883–13891.
94. De Carvalho, P. B.; Ramos, D. C. C.; Cotrim, P. C.; Ferreira, E. I. Synthesis and in vitro evaluation of potential anti-leishmanial targeted drugs of pyrimethamine. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 2109–2116.
95. Molyneux, D. H.; Ashford, R. W., Eds. *The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals*. International Publications: New York, **1983**; pp. 211–249.
96. Chakraborty, R.; Chakraborty, P.; Basu, M. K. Macrophage mannosyl fucosyl receptor: Its role in invasion of virulent and avirulent *L. donovani* promastigotes. *Biosci. Rep.* **1998**, *18*, 129–142.
97. Croft, S. L.; Hogg, J.; Gutteridge, W. E.; Hudson, A. T.; Randall, A. W. The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chem.* **1992**, *30*, 827–832.
98. Mäntylä, A.; Garnier, T.; Rautio, J.; Nevalainen, T.; Vepsäläinen, J.; Koskinen, A.; Croft, S. L.; Järvinen, T. Synthesis, in vitro evaluation and antileishmanial activity of water-soluble prodrugs of buparvaquone. *J. Med. Chem.* **2003**, *47*, 188–195.

99. Mäntylä, A.; Rautio, J.; Nevalainen, T.; Vepsäläinen, J.; Juvonen, R.; Kendrick, H.; Garnier, T.; Croft, S.L.; Järvinen, T. Synthesis and antileishmanial activity of novel buparvaquone oxime derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3497–3502.
100. Mäntylä, A.; Garnier, T.; Rautio, J.; Nevalainen, T.; Vepsäläinen, J.; Koskinen, A.; Croft, S. L.; Järvinen, T. Synthesis, in Vitro Evaluation, and Antileishmanial Activity of Water-Soluble Prodrugs of Buparvaquone. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 188–195.
101. Fleisher, D.; Bong, R.; Stewart, B. H. Improved oral drug delivery: solubility limitations overcome by the use of prodrugs. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, *19*, 115–130.
102. Varia, S. A.; Schuller, S.; Sloan, K. B.; Stella, V. J. Phenytoin prodrugs III: water-soluble prodrugs for oral and/or parenteral use. *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73*, 1068–1073.
103. Krise, J. P.; Zygmunt, J.; Georg, G. I.; Stella, V. J. Novel prodrug approach for tertiary amines: synthesis and preliminary evaluation of *n*-phosphonooxymethyl prodrugs. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3094–3100.
104. Garnier, T.; Mäntylä, A.; Järvinen, T.; Lawrence, J.; Brown, M.; Croft, S. *In vivo* studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *60*, 802–810.
105. Mäntylä, A.; Rautio, J.; Nevalainen, T.; Keski-Rahkonen, P.; Vepsäläinen, J.; Järvinen, T. Design, synthesis and in vitro evaluation of novel water-soluble prodrugs of buparvaquone. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *23*, 151–158.
106. Jousserandot, A.; Boucher, J. L.; Henry, Y.; Niklaus, B.; Clement, B.; Mansuy, D. Microsomal cytochrome P450 dependent oxidation of *N*-hydroxyguanidines, amidoximes, and ketoximes: mechanism of the oxidative cleavage of their C=N(OH) bond with formation of nitrogen oxides. *Biochemistry* **1998**, *37*, 17179–17191.
107. Chattopadhyay, R.; Mahajan, B.; Kumar, S. Assessment of safety of the major antimalarial drugs. *Expert Opin Drug Saf.* **2007**, *6*, 505–21.
108. Ferreira, E. I.; Cruz, M. L.; Korolkovas, A. Latentiation of chemotherapeutic agents. Part 1: synthesis of oxidized starch imine derivatives and antimalarials. *Starch/starke* **1992**, *44*, 21–24.
109. Ohara, M. T.; Sakuda, T. M.; Cruz, M. L.; Ferreira, E. I.; Korolkovas, A. Antimalarial Activity Of Imine Oxidized Starch And Cellulose Derivatives. *Boll. Chim. Farm.* **1995**, *9*, 522–527.
110. Cruz, M. L.; Ferreira, E. I.; Korolkovas, A. Latentiation of chemotherapeutic agents. Part 2: synthesis of oxidized cellulose imine derivatives and antimalarials. *Starch/Stärke* **1997**, *49*, 66–70.
111. Van Deenen, L. L. M.; De Gier, J. Lipids of the red cell membrane. In *The red blood cell*. Surgenor, G., (ed.); Academic Press, Inc.: New York, N.Y., **1975**; pp. 147–211.
112. Nicolas, O.; Margout, N. T.; Wein, S.; Calas, M.; Vial, H. J.; Bressolle, F. M. Pharmacological Properties of a New Antimalarial Bisthiazolium Salt, T3, and a Corresponding Prodrug, TE3. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 3631–3639.
113. Vial, H.J.; Wein, S.; Farenc, C.; Kocken, C.; Nicolas, O.; Ancelin, M. L.; Bressolles, F.; Thomas, A.; Calas, M. Prodrugs of bisthiazolium salts are orally potent antimalarials. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 15458–15463.

114. Calas, M.; Ancelin, M. L.; Cordina, G.; Portefaix, P.; Piquet, G.; Vidal-Sailhan, V.; Vial, H. Antimalarial Activity of Compounds Interfering with *Plasmodium falciparum* Phospholipid Metabolism: Comparison between Mono- and Bisquaternary Ammonium Salts. *J. Med. Chem.*, **2000**, *43*, 505–516.
115. Wiesner, J.; Hintz, M.; Altincicek, B.; Sanderbrand, S.; Weidemeyer, C.; Beck, E.; Jomaa, H. *Plasmodium falciparum*: Detection of the Deoxyxylulose 5-Phosphate Reductoisomerase Activity. *Exp. Parasitol.* **2000**, *96*, 182–186.
116. Lell, B.; Ruangweeraayut, R.; Wiesner, J.; Missinou, M. A.; Schindler, A.; Baranek, T.; Hintz, M.; Hutchinson, D.; Jomaa, H.; Kremsner, P. G. Fosmidomycin, a Novel Chemotherapeutic Agent for Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 735–738.
117. Jomaa, H.; Wiesner, J.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Weidemeyer, C.; Hintz, M.; Turbachova, I.; Eberl, M.; Zeidler, J.; Lichtenthaler, H. K.; Soldati, D.; Beck, E. Inhibitors of the Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis as Antimalarial Drugs. *Science*. **1999**, *285*, 1573–1576.
118. Tsuchiya, T.; Ishibashi, K.; Terakawa, M.; Nishiyama, M.; Itoh, N.; Noguchi, H. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* Pharmacokinetics and metabolism of fosmidomycin, a new phosphonic acid, in rats and dogs. **1982**, *7*, 59–64.
119. Reichenberg, A.; Wiesner, J.; Weidemeyer, C.; Dreiseidler, E.; Sanderbrand, S.; Altincicek, B.; Beck, E.; Schlitzer, M.; Jomaa, H. Diaryl Ester Prodrugs of FR900098 with Improved In Vivo Antimalarial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 833–835.
120. Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henscker, D.; Beck, E.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Acyloxyalkyl ester prodrugs of fr900098 with improved in vivo anti-malarial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2163–2166.
121. Ortmann, R.; Wiesner, J.; Reichenberg, A.; Henschker, E. B.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Alkoxy-carbonyloxyethyl Ester Prodrugs of FR900098 with Improved In Vivo Antimalarial Activity. *Arch. Pharm. Chem. Life. Sci.* **2005**, *338*, 305–314.
122. Hindley, S.; Ward, S. A.; Storr, R. C.; Searle, N. L.; Bray, P. G.; Park, K.; Davies, J.; O’Neil, P. M. Mechanism-Based Design of Parasite-Targeted Artemisinin Derivatives: Synthesis and Antimalarial Activity of New Diamine Containing Analogues *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1052–1063.
123. O’Neil, P.; Posner, G. H. A Medicinal Chemistry Perspective on Artemisinin and Related Endoperoxides. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2945–2964.
124. Borstnik, K.; Paik, I-H.; Posner, G. H. Malaria: New Chemotherapeutic Peroxide Drugs. *Mini Rev. Med. Chem.* **2002**, *2*, 573–583.
125. Cumming, J. N.; Ploypradith, P.; Posner, G. H. Antimalarial activity of artemisinin (qinghaosu) and related trioxanes: mechanism(s) of action. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *37*, 253–297.
126. O’Neil, P.; Stocks, P. A.; Pugh, M. D.; Araujo, N. C.; Korshin, E.; Bickley, J. F.; Ward, S. A.; Bray, P. G.; Pasini, E.; Davies, J.; Verissimo, E.; Bach, M. D. Design and Synthesis of Endoperoxide Antimalarial Prodrug Models. *Angew. Chem.* **2004**, *43*, 4193–4197.
127. Jefford, A. W. Why Artemisinin and Certain Synthetic Peroxides are Potent Antimalarials. Implications for the Mode of Action. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1803–1826.

128. Eckstein-Ludwig, U.; Webb, R. J.; van Goethem, I. D. A.; East, J. M.; Lee, A. G.; Kimura, M.; O'Neil, P. M.; Bray, P. G.; Ward, S. A.; Krishna, S. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2003**, *424*, 957–961.
129. Li, R.; Kenyon, G. L.; Cohen, F. E.; Chen, X.; Gong, B.; Dominguez, J. N.; Davidson, E.; Kurzban, G.; Miller, R. E.; Nuzum, E. O.; Rosenthal, P. J.; McKerrow, J. H. In Vitro Antimalarial Activity of Chalcones and Their Derivatives. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 5031–5037.
130. Atamna, H.; Ginsburg, H. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24876–24883.
131. Schirmer, R. H.; Müller, J. G.; Krauth-Siegel, R. L. Disulfide reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: the design of drugs for trypanosomiasis and malaria *Angew. Chem. Int. Edn.* **1995**, *34*, 141–154.
132. Davioud-Charvet, E.; Delarue, S.; Biot, C.; Schwobel, B.; Boehme, C. C.; Mussigbrodt, A.; Maes, L.; Sergheraert, C.; Grellier, P.; Schirmer, R. H.; Becker, K. A prodrug for of a *Plasmodium falciparum* glutathione reductase inhibitor conjugated with a 4-anilinoquinoline. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4268–4276.
133. Meierjohann, S.; Walter, R. D.; Muller, S. Regulation of intracellular glutathione levels in erythrocytes infected with chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **2002**, *368*, 761–768.
134. Biot, C.; Dessolin, J.; Grellier, P.; Davioud-Charvet, E. Double-drug development against antioxidant enzymes from *Plasmodium falciparum*. *Redox Rep.* **2003**, *8*, 280–283.
135. Gomes, P.; Araujo, M. J.; Rodriguez, M.; Vale, N.; Azevedo, Z.; Iley, J.; Chambel, P.; Morais, J.; Moreira, R. Synthesis of imidazolidin-4-one and 1H-imidazo[2,1-a]isoindole-2,5(3H,9bH)-dione derivatives of primaquine: scope and limitations. *Tetrahedron.* **2004**, *60*, 5551–5562.
136. Brueckner, R. P.; Ohrt, C.; Baird, J. K.; Milhous, W. K. In *Antimalarial Chemotherapy*; Rosenthal, P. J., Ed.; Humana: Totowa, **2001**; pp. 123–151.
137. Trouet, A.; Pirson, P.; Steiger, R.; Masquelier, M.; Baurain, R.; Gillet, J. Development of new derivatives of primaquine by association with lysosomotropic carriers. *Bull. World Health Org.* **1981**, *59*, 449–458.
138. Philip, A.; Kepler, J. A.; Johnson, B. H.; Carroll, F. I. Peptide Derivatives of Primaquine as Potential Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 870–874.
139. Pauletti, G. M.; Gangwar, S.; Siahaan, T. J.; Aube, J.; Borchardt, R. T. Improvement of oral peptide bioavailability: Peptidomimetics and prodrug strategies. *Adv. Drug. Del. Rev.* **1997**, *27*, 235–256.
140. Bundgaard, H. (C) Means to enhance penetration: (1) Prodrugs as a means to improve the delivery of peptide drugs. *Adv. Drug. Del. Rev.* **1992**, *8*, 1–38.
141. Borissova, R.; Stjarnkvist, P.; Karlsson, M. O.; Sjöholm, I. Biodegradable microspheres. 17. Lysosomal degradation of primaquine-peptide spacer arms. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 256–262.
142. Portela, M. J.; Moreira, R.; Valente, E.; Constantino, L.; Iley, J.; Pinto, J.; Rosa, R.; Cravo, P.; do Rosario, V. E. Dipeptide Derivatives of Primaquine as Transmission-Blocking Antimalarials: Effect of Aliphatic Side-Chain Acylation on the Gametocytocidal Activity and on the Formation of Carboxyprimaquine in Rat Liver Homogenates. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 949–955.

143. Bak, A.; Fich, M.; Larsen, B. D.; Frokjaer, S.; Friis, G. J. N-terminal 4-imidazolidinone prodrugs of Leu-enkephalin: synthesis, chemical and enzymatic stability studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1999**, *7*, 317–323.
144. Araujo, M. J.; Bom, J.; Capela, R.; Casimiro, C.; Chambel, P.; Gomes, P.; Iley, J.; Lopes, F.; Morais, J.; Moreira, R.; de Oliveira, E.; do Rosario, V.; Vale, N. Imidazolidin-4-one Derivatives of Primaquine as Novel Transmission-Blocking Antimalarials. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 888–892.
145. Vagapandu, S.; Sachdeva, S.; Jain, M.; Singh, S.; Singh, P. P.; Kaul, C. L.; Jain, R. 8-Quinolinamines and Their Pro Prodrug Conjugates as Potent Blood-Schizontocidal Antimalarial Agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4557–4568.
146. Goldberg, D. E.; Slater, A. F.; Beavis, R.; Chait, B.; Cerami, A.; Henderson, G. Hemoglobin degradation in the human malaria pathogen *Plasmodium falciparum*: a catabolic pathway initiated by a specific aspartic protease. *J. Exp. Med.* **1991**, *173*, 961–969.
147. Romeo, S.; Dell'Agli, M.; Parapini, S.; Rizzi, L.; Galli, G.; Mondani, M.; Sparatore, A.; Taramelli, D.; Bosisio, E. Plasmepsin II inhibition and antiplasmodial activity of Primaquine–Statine ‘double-drugs’. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2931–2934.
148. Yuthavong, Y. Basis for antifolate action and resistance in malaria. *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 175–182.
149. Rieckmann, K. H. The *in vitro* activity of experimental antimalarial compounds against strains of *Plasmodium falciparum* with varying degrees of sensitivity to pyrimethamine and chloroquine. In *Chemotherapy of malaria and resistance to antimalarials* (World Health Organization Technical Report Series); World Health Organization: Geneva, Switzerland, **1973**; p. 58.
150. Yuvaniyama, J.; Chitnumsub, P.; Kamchonwongpaisan, S.; Vanichtanankul, J.; Sirawaraporn, W.; Taylor, P.; Walkinshaw, M. D.; Yuthavong, Y. Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 357–365.
151. Rieckmann, K. H.; Yeo, A. E.; Edstein, M. D. Activity of PS-15 and its metabolite, WR99210, against *Plasmodium falciparum* in an *in vivo-in vitro* model. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1996**, *90*, 568–571.
152. Canfield, C. J.; Milhous, W. K.; Ager, A. L.; Rossan, R. N.; Sweeney, T. R.; Lewis, N. J.; Jacobus, D. P. PS-15: a potent, orally active antimalarial from a new class of folic acid antagonists. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *49*, 121–126.
153. Shearer, T. W.; Kozar, M. P.; O’Neil, M. T.; Smith, P. L.; Schiehser, G. A.; Jacobus, D. P.; Diaz, D. S.; Yang, Y-S.; Milhous, W. k.; Skillman, D. R. In Vitro Metabolism of Phenoxypropoxybiquanide Analogues in Human Liver Microsomes to Potent Antimalarial Dihydrotriazines. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2805–2813.
154. Wiesner, J.; Kettler, K.; Sakowski, J.; Ortmann, R.; Katzin, A. M.; Kimura, E. A.; Silber, K.; Klebe, G.; Jomaa, H.; Schlitzer, M. Farnesyltransferase inhibitors inhibit the growth of malaria parasites *in vitro* and *in vivo*. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 251–254.
155. Casey, P. J.; Seabra, M. C. Protein Prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5289–5292.
156. Ohkanda, J.; Lockman, J. W.; Yokoyama, K.; Gelb, M. H.; Croft, S. L.; Kendrick, H.; Harrell, M. I.; Feagin, J. E.; Blaskovich, M. A.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. Peptidomimetic inhibitors of protein farnesyltransferase show potent antimalarial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 761–764.

157. Carrico, D.; Ohkanda, J.; Kendrick, H.; Yokoyama, K.; Blaskovich, M. A.; Bucher, C. J.; Buckner, F. S.; van Voorhis, W. C.; Chakrabarti, D.; Croft, S.; Gelb, M. H.; Sebti, S. M.; Hamilton, A. D. In vitro and in vivo antimalarial activity of peptidomimetic protein farnesyltransferase inhibitors with improved membrane permeability. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 6517–6526.
158. Ledig, K. W. 7-(Substituted)-7H-pyrrolo[3,2-f]quinazoline-1,3-diamines. *U.S. Patent 4,118,561*, **1978**.
159. Davoll, J.; Johnson, A. M.; Davies, H. J.; Bird, O. D.; Clarke, J.; Elslager, E. F. Folate antagonists. 2. 2,4-Diamino-6-((aralkyl and (heterocyclic) methyl)amino)quinazolines, a novel class of antimetabolites of interest in drug-resistant malaria and Chagas' disease. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 812–826.
160. Elslager, E. F.; Bird, O. D.; Clarke, J.; Perricone, S. C.; Worth, D. F. Folate antagonists. 9. 2,4-Diamino-6-((aralkyl)alkylamino)quinazolines, a potent class of antimetabolites with prodigious antimalarial effects. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 1138–1146.
161. Hua, H.; Cheng, M.; Li, X.; Pei, Y. A new pyrroloquinazoline alkaloid from *Linaria vulgaris*. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1393–1394.
162. Guan, J.; Zhang, Q.; O'Neil, M.; Obaldia III, N.; Ager, A.; Gerena, L.; Lin, A. J. Antimalarial activity of new pyrrolo[3,2-f]Quinazoline-1,3-Diamine derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4928–4933.
163. Xie, L. H.; Li, Q.; Lin, A. J.; Smith, K.; Zhang, J.; Skillman, D. New Potential Antimalarial Agents: Therapeutic-Index Evaluation of Pyrroloquinazolinediamine and Its Prodrugs in a Rat Model of Severe Malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1649–1655.
164. Weller, T.; Alig, L.; Beresini, M.; Blackburn, B.; Bunting, S.; Hadvary, P.; Muller, M. H.; Knopp, D.; Levet-Trafit, B.; Lipari, M. T.; Modi, N. B.; Muller, M.; Refino, C. J.; Schmitt, M.; Schonholzer, P.; Weiss, S.; Steiner, B. Orally Active Fibrinogen Receptor Antagonists. 2. Amidoximes as Prodrugs of Amidines. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3139–3147.
165. Zhou, L.; Lee, K.; Thakker, D. R.; Boykin, D. W.; Tiwell, R. R.; Hall, J. E. Enhanced Permeability of the Antimicrobial Agent 2,5-Bis(4-Amidinophenyl)Furan Across Caco-2 Cell Monolayers Via Its Methylamidoxime Prodrug. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1689–1685.
166. Kitamura, S. F. H.; Miyawaki, T.; Kawamura, M.; Terashita, Z.-I.; Naka, T. Orally Active GPIIb/IIIa Antagonists: Synthesis and Biological Activities of Masked Amidines as Prodrugs of 2-[(3S)-4-[(2S)-2-(4-Amidinobenzoylamino)-3-(4-methoxyphenyl)propanoyl]-3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-2-oxopiperazinyl]acetic Acid. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 268–277.
167. Rehse, K.; Bade, S.; Harsdorf, A.; Clement, B. New NO-Donors with Antithrombotic and Vasodilating Activities, Part 17. Arylazoamidoximes and 3-Arylazo-1,2,4-oxadiazol-5-ones. *Arch. Pharm.* **1997**, *330*, 392–398.
168. Boykin, D. W.; Kumar, A.; Hall, J. E.; Bender, B. C.; Tidwell, R. R. Anti-pneumocystis activity of bis-amidoximes and bis-o-alkylamidoximes prodrugs *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 3017–3020.
169. Berger, B. J.; Lombardy, R. J.; Marbury, G. D.; Bell, C. A.; Dykstra, C. C.; Hall, J. E.; Tidwell, R. R. Metabolic N-hydroxylation of pentamidine *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 1678–1684.

170. Clement, B.; Lomb, R.; Moller, W. Isolation and Characterization of the Protein Components of the Liver Microsomal O₂-insensitive NADH-Benzamidoxime Reductase. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19615–19620.
171. Outtara, M.; Wein, S.; Calas, M.; Hoang, Y. V.; Vial, H.; Escale, R. Synthesis and antimalarial activity of new 1,12-bis- (N,N)-acetamidinyl)dodecane derivatives *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 593–596.
172. Cerami, C.; Frevert, U.; Sinnis, P.; Takacs, B.; Clavijo, P.; Santos, M. J.; Nussenzweig, V. The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell.* **1992**, *70*, 1021–1033.
173. Ding, Z. M.; Cristiano, R. J.; Roth, J. A.; Takacs, B.; Kuo, M. T. Malarial circumsporozoite protein is a novel gene delivery vehicle to primary hepatocyte cultures and cultured. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3667–3676.
174. Lin-Lee, Y-C.; Nakamura, S.; Gandhi, V.; Curley, S. A.; Stüber, D.; Burkot, T. R.; Kuo, M. T. Prolonged stability and sustained prodrug cell killing activity using receptor-mediated delivery of malarial circumsporozoite-cytosine deaminase fusion protein into liver cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 461–467.
175. Nussenzweig, V. Malaria sporozoites and chylomicron remnants compete for binding sites in the liver. *Behring Inst. Mitt.* **1997**, *99*, 85–89.
176. Parise Filho, R.; Menezes, C.M.S.; Pinto, P.L.S.; Paula, G.A.; Brandt, C.A.; Siveira, M.A.B. Design, synthesis, and in vivo evaluation of oxamniquine methacrylate and acrylamide prodrugs. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1229–1236.
177. Almeida, A.E.; Ferreira, A.G.; Crespi, M.S.; Andrade, Z.A.; Man-Chin, C. Synthesis and thermal study of prodrug of oxamniquine. *J. Therm. Anal. Cal.*, **2006**, *83*, 277–281.
178. El-Hamouly, W.; Pica-Mattocia, L.; Cioli, D.; Schwartz, H.M.; Archer, S. Studies on some derivatives of oxamniquine. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1629–1631.
179. Shaohong, L.; Kumagai, T.; Qinghua, A.; Xiaolan, Y.; Ohmae, H.; Yabu, Y.; Siwen, L.; Liyong, W.; Maruyama, H.; Ohta, N. Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. *Parasitol. Int.* **2006**, *55*, 63–68.
180. Utzinger, J.; Chollet, J.; Tu, Z.; Shuhua, X.; Tanner, M. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hy.* **2002**, *96*, 318–323.
181. Jiraungkoorskul, W.; Sahaphong, S.; Sobhon, P.; Riengrojpitak, S.; Kangwanransan, N. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. *Parasitol. Int.* **2005**, *54*, 177–183.
182. Zhang, Y.; Scorpio, A.; Nikaido, H. Role of acid pH and deficient efflux of pyrazinoic acid in unique susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2044–9.
183. Zhang, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 529–64.

184. Scorpio, A.; Zhang, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat. Med.* **1996**, *2*, 662–667.
185. Hanouille, X.; Wieruszkeski, J-M.; Rousselot-Pailley, P.; Landrieu, I.; Locht, C.; Lippens, G.; Baulard, A. R. Selective intracellular accumulation of the major metabolite issued from the activation of the prodrug ethionamide in mycobacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 768–772.
186. DeBarber, A. E.; Mdluli, K.; Bosman, M.; Bekker, L. G.; Barry III, C. E. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 9677–9682.
187. Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature.* **1992**, *358*, 591–593.
188. Heym, B.; Zhang, Y.; Poulet, S.; Young, D.; Cole, S. T. Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 4255–4259.
189. Ghiladi, R. A.; Medzihardsky, K. F.; Rusnak, F. M.; de Montellano, P. R. O. Correlation between isoniazid resistance and superoxide reactivity in mycobacterium tuberculosis *katG*. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13428–13442.
190. Vannelli, T. A.; Dykman, A.; de Montellano, P. R. O. The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12824–12829.
191. Fraaije, M. W.; Kamerbeek, N. M.; Heidekamp, A. J.; Fortin, R.; Janssen, D. B. The prodrug activator etaa from *Mycobacterium tuberculosis* is a baeyer-villiger monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 3354–3360.
192. Baulard, A. R.; Betts, J. C.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; McAdam, R. A.; Brennan, P. J.; Locht, C.; Besra, G. S. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28326–28331.
193. Phetsuksiri, B.; Baulard, A. R.; Cooper, A. M.; Minnikin, D. E.; Douglas, J. D.; Besra, G. S.; Brennan, P. J. Antimycobacterial Activities of Isoxyl and New Derivatives through the Inhibition of Mycolic Acid Synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1042–1051.
194. Qian, L.; de Montellano, P. R. O. Oxidative activation of thiacetazone by the *mycobacterium tuberculosis* flavin monooxygenase etaa and human *fmo1* and *fmo3*. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 443–449.
195. Kathleen, P. *Martindale: The Complete Drug Reference, 32nd Edn.*; Pharmaceutical Press: Chicago, USA, **1999**; p. 151.
196. Byrd, R. B.; Horn, B. R.; Solomon, D. A.; Griggs, G. W. Toxic effects of isoniazid in tuberculosis chemoprophylaxis. Role of biochemical monitoring in 1,000 patients. *JAMA.* **1979**, *241*, 1239–1241.
197. Miller, R. R.; Porter, J.; Greenblatt, D. J. Clinical importance of the interaction of phenytoin and isoniazid: a report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program. *Chest.* **1979**, *75*, 356–8.
198. Prateek, J. R.; Jaim, K.; Ravichandran, V.; Agrawal, R. K. Synthesis and evaluation of mutual prodrugs of isoniazid, *p*-amino salicylic acid and ethambutol. *Arkivoc* **2007**, *1*, 105–118.

199. Wayne, L. G. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1994**, *13*, 908–914.
200. Wayne, L. G.; Hayes, L. G. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 2062–2069.
201. Samuelson, J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1533–1541.
202. Brooks, J. V.; Furney, S. K.; Orme, I. M. Metronidazole therapy in mice infected with tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1285–1288.
203. Lenaerts, A. J.; Gruppo, V.; Marietta, K. S.; Johnson, C. M.; Driscoll, D. K.; Tompkins, N. M.; Rose, J. D.; Reynolds, R. C.; Orme, I. M. Preclinical testing of the nitroimidazopyran PA-824 for activity against *Mycobacterium tuberculosis* in a series of in vitro and in vivo models. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 2294–2301.
204. Manjunatha, U. H.; Boshoff, H.; Dowd, C. S.; Zhang, L.; Albert, T. J.; Norton, J. E.; Daniels, L.; Dick, T.; Pang, S. S.; Barry, C. E. Identification of a nitroimidazo-oxazine-specific protein involved in PA-824 resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2006**, *103*, 431–436.
205. Stover, C. K.; Warren, P.; Vandevanter, D. R.; Sherman, D. R.; Arain, T. M.; Langhorne, M. H.; Anderson, S. W.; Towell, J. A.; Yuan, Y.; McMurray, D. N.; Kreiswirth, B. N.; Barry, C. E.; Baker, W. R. A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* **2000**, *405*, 962–966.
206. Papadopoulos, M. V.; Bloomer, W. D.; McNeil, M. R. NLCQ-1 and NLCQ-2, two new agents with activity against dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2007**, *29*, 724–727.
207. Papadopoulos, M. V.; Ji, M.; Rao, M. K.; Bloomer, W. D. 4-[3-(2-Nitro-1-imidazolyl)-propylamino]-7-chloroquinoline hydrochloride (NLCQ-1), a novel bioreductive compound as a hypoxia-selective cytotoxin. *Oncol. Res.* **2000**, *12*, 185–192.
208. Papadopoulos, M. V.; Ji, M.; Rao, M. K.; Bloomer, W. D. Reductive metabolism of the nitroimidazole-based hypoxia-selective cytotoxin NLCQ-1 (NSC 709257). *Oncol. Res.* **2003**, *14*, 21–29.
209. Sriram, D.; Yogeeswari, P. Towards the design and development of agents with broad spectrum chemotherapeutic properties for the effective treatment of HIV / AIDS. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1909–1915.
210. Sriram, D.; Yogeeswari, P.; Narasimharaghavan, S.; Bai, T. R. Synthesis of stavudine amino acid ester prodrugs with broad-spectrum chemotherapeutic properties for the effective treatment of HIV/AIDS. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1085–1087.
211. Sriram, D.; Bal, T. R.; Yogeeswari, P. Design, synthesis and biological evaluation of novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors with broad-spectrum chemotherapeutic properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 5865–5873.
212. Sriram, D.; Srichakravarthy, N.; Bal, T. R.; Yogeeswari, P. Dossier: HIV/AIDS: New approaches in chemotherapy and Immunotherapy. Synthesis of zidovudine prodrugs with broad-spectrum

- chemotherapeutic properties for the effective treatment of HIV/AIDS. *Biomed. Pharmacother.* **2005**, *59*, 452–455.
213. Sriram, D.; Yogeewari, P.; Gopal, G. Synthesis, anti-HIV and antitubercular activities of lamivudine prodrugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1373–1376.
214. Steinberg, T. H. Cellular transport of drugs. *Clin. Infect. Dis.* **1994**, *19*, 916–921.
215. Donowitz, G. R. Tissue-directed antibiotics and intracellular parasites: complex interaction of phagocytes, pathogens, and drugs. *Clin. Infect. Dis.* **1994**, *19*, 926–930.
216. Gordon, S.; Rabinowitz, S. Macrophages as targets for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1989**, *4*, 27–47.
217. Roseeuw, E.; Coessens, V.; Balazuc, A-M.; Lagranderie, M.; Chavarot, P.; Pessina, A.; Néri, M. G.; Schacht, E.; Marchal, G.; Domurado, D. Synthesis, Degradation, and Antimicrobial Properties of Targeted Macromolecular Prodrugs of Norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 3435–3441.
218. Roseeuw, E.; Coessens, V.; Schat, E.; Vrooman, B.; Domurado, D.; Marchal, G. Polymeric prodrugs of antibiotics with improved efficiency. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1999**, *10*, 743–746.
219. Aubrée-Lecat, A.; Duban, M-C.; Demignot, S.; Domurado, M.; Fournié, P.; Domurado, D. Influence of barrier-crossing limitations on the amount of macromolecular drug taken up by its target. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1993**, *21*, 75–98.
220. Balazuc, A. M.; Lagranderie, M.; Chavarot, P.; Pescher, P.; Roseeuw, E.; Schacht, E.; Domurado, D.; Marchal, G. In vivo efficiency of targeted norfloxacin against persistent, isoniazid-insensitive, *Mycobacterium bovis* BCG present in the physiologically hypoxic mouse liver. *Microbes Infect.* **2005**, *7*, 969–975.
221. Silva, M.; Lara, A. S.; Leite, C. Q. F.; Ferreira, E. I. Potential tuberculostatic agents: micelle-forming copolymer poly(ethyleneglycol)-poly(aspartic acid) prodrug with isoniazid. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2001**, *334*, 189–193.
222. Silva, M.; Ricelli, N. L.; Seoud, O. E.; Valentim, C. S.; Ferreira, A.; Sato, D. N.; Leite, C. Q. F.; Ferreira, E. I. Potential Tuberculostatic Agent: Micelle-forming Pyrazinamide Prodrug. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2006**, *339*, 283–290.
223. Yokoyama, M.; Miyauchi, M.; Yamada, N.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K.; Inoue, S. Polymer micelles as novel drug carriers: adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer. In *Advances in Drug Delivery Systems*; Anderson, J. M., Kim, S. W., Knutson, K., Eds.; Elsevier: Amsterdam, **1990**; Vol. 4, pp. 269–278.
224. Nakanishi, T.; Fukushima, S.; Okamoto, K.; Suzuki, M.; Matsumura, Y.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *J. Control Release.* **2001**, *74*, 295–302.
225. Rando, D. G.; Brandt, C. A.; Ferreira, E. I. Use of *N*-methylene phosphonic chitosan to obtain an isoniazid prodrug. *Rev. Bras. Ciên. Farm.* **2004**, *40*, 335–344.
226. Shibata, Y.; Metzger, W. J.; Myrvik, Q. N. Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *J. Immunol.* **1997**, *159*, 2462–2467.

227. Heras, A.; Rodríguez, N.M.; Ramos, V.M.; Agulló, E. *N*-methylene phosphonic chitosan: a novel soluble derivative. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *44*, 1–8.
228. Jones, R. N.; Ross, J. E.; Fritsche, T. R.; Sader, H. S. *J. Oxazolidinone susceptibility patterns in 2004: report from the Zyvox Annual Appraisal of Potency and Spectrum (ZAAPS) program assessing isolates from 16 nations. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 279–287.
229. Vera-Cabrera, L.; Ochoa-Felix, E. Y.; Gonzalez, G.; Tijerina, R.; Choi, S. H.; Welsh, O. In vitro activities of new quinolones and oxazolidinones against *Actinomyces madurae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 1037–1039.
230. Vera-Cabrera, L.; Castro-Garza, J.; Rendon, A.; Ocampo-Candiani, J.; Welsh, O.; Choi, S. H.; Blackwood, K.; Molina-Torres, C. In vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to garenoxacin and DA-7867. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4351–4353.
231. Vera-Cabrera, L.; Gonzalez, E.; Choi, S. H.; Welsh, O. In vitro activities of new antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 602–604.
232. Gomez-Flores, A.; Welsh, O.; Said-Fernandez, S.; Lozano-Garza, G.; Tavaréz-Alejandro, R. E.; Vera-Cabrera, L. In vitro and in vivo activities of antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 832–837.
233. Fortun, J.; Martin-Davila, P.; Navas, E.; Perez-Elias, M. J.; Cobo, J.; Tato, M.; De la Pedrosa, E. G.; Gomez-Mampaso, E.; Moreno S. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56*, 180–185.
234. Shinabarger, D. Mechanism of action of the oxazolidinone antibacterial agents. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **1999**, *8*, 1195–1202.
235. Vera-Cabrera, L.; Gonzalez, E.; Rendon, A.; Ocampo-Candiani, J.; Welsh, O.; Velazquez-Moreno, V. M.; Choi, S. H.; Molina-Torres, C. In Vitro Activities of DA-7157 and DA-7218 against *Mycobacterium tuberculosis* and *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 3170–3172.
236. Cummings, J.H. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* **1981**, *22*, 763–779.
237. Kruh, J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol. Cell Biochem.* **1982**, *42*, 65–82.
238. Nudelman, A.; Gnizi, E.; Katz, Y.; Azulai, R.; Cohen-Ohana, M.; Zhuk, R.; Sampson, S.R.; Langzam, L.; Fibach, E.; Prus, E.; Pugach, V.; Rephaeli, A. Prodrugs of butyric acid. Novel derivatives possessing increased aqueous solubility and potential for treating cancer and blood diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 63–74.
239. Dover, G.J.; Brusilow, S.; Samid, D. Increased fetal hemoglobin in patients receiving sodium 4-Phenylbutyrate. *New Engl. J. Med.* **1992**, *327*, 569–570.
240. Charache, S.; Terrin, M.L.; Moore, R.D.; Dover, G.J.; Barton, F.B.; Eckert, S.V.; McMahon, R.P.; Bonds, D.R. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia *N. Engl. J. Med.* **1995**, *332*, 1317–1322.
241. Atweh, G.F.; Sutton, M.; Nassif, I.; Boosalis, V.; Dover, G.J.; Wallenstein, S.; Wright, E.; McMahon, L.; Stamatoyannopoulos, G.; Faller, D.V.; Perrine, S.P. Sustained induction of fetal hemoglobin by pulse butyrate therapy in sickle cell disease. *Blood* **1999**, *93*, 1790–1797.

242. Safo, M.K.; Abdulmalik, O.; Danso-Danquat, R.; Burnett, J.C.; Nokuri, S.; Joshi, G.S.; Musayev, F.N.; Asakura, T.; Abraham, D.J. Structural basis for the potent antisickling effects of a novel class of five membered heterocyclic aldehydic compounds. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4665–4676.
243. Zaugg, R.H.; Walder, J.A.; Klotz, I.M. Schiff base adducts of hemoglobin. Modifications that inhibit erythrocyte sickling. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 8542–8548.
244. Abraham, D.J.; Mehanna, A.S.; Wireko, F.C.; Whitney, J.; Thomas, R.P.; Orringer, E.P. Vanillin, a potential agent for the treatment of sickle cell anemia. *Blood* **1991**, *77*, 1334–1341.
245. Safo, M.K.; Danso-Danquat, R.; Joshi, G.S.; Abraham, D.J. Antisickling agents. *US2005/0209199 A1*, **2005**.
246. Zhang, C.; Li, X.; Lian, L.; Chen, Q.; Abdulmalik, O.; Vassilev, V.; Lai, C.S.; Asakura, T.; Anti-sickling effect of MX-1520, a prodrug of vanillin: an in vivo study using rodents. *Br. J. Haematol.* **2004**, *125*, 788–795.
247. Yarbro, J.M. Mechanism of action of hydroxyurea. *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 1–10.
248. Hanft, V.N.; Fruchtman, S.R.; Pickens, C.V.; Rosse, W.F.; Howard, T.A.; Ware, R.E. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. *Blood* **2000**, *95*, 3589–3593.
249. Steinberg, M.H.; Barton, F.; Castro, O.; Pegelow, C.H.; Balas, S.K.; Kutlar, A.; Orringer, E.; Bellevie, R.; Olivieri, N.; Eckman, J.; Varma, M.; Ramirez, G.; Adler, B.; Smith, W.; Carlos, T.; Ataga, K.; Decastro, L.; Bjelow, C.; Sauntharajah, Y.; Telfer, M.; Bonds, D.; Terrin, M. Effect Of Hydroxyurea On Mortality And Morbidity In Adult Sickle Cell anemia: risks and benefits up to nine years of treatment. *JAMA* **2003**, *289*, 1645–1651.
250. Charache, S.; Barton, F.B.; Moore, R.D.; Terrin, M.L.; Steinberg, M.H.; Dover, G.J.; Ballas, S.K.; McMahon, R.P.; Castro, O.; Orringer, E.P. Hydroxyurea and sickle cell anemia. Clinical utility of a myelosuppressive "switching" agent. The Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. *Medicine* **1996**, *75*, 300–326.
251. Space, S.L.; Lane, P.A.; Pickett, C.K.; Weil, J.L. nitric oxide attenuates normal and sickle red blood cell adherence to pulmonary endothelium. *Am. J. Hematol.* **2000**, *63*, 200–204.
252. Conran, N.; Oresco-Santos, C.; Acosta, H.C.; Fattori, A.; Saad, S.T.; Costa, F.F. Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. *Br. J. Haematol.* **2004**, *124*, 547–554.
253. Minamiyama, Y.; Takemura, S.; Hai, S.; Suehiro, S.; Okada, S.; Funae, Y. Nicorandil Elevates Tissue cGMP Levels in a Nitric-Oxide-Independent Manner. *J. Pharmacol. Sci.* **2007**, *103*, 33–39.
254. Cokic, V.P.; Smith, R.D.; Beleslin-cokic, B.B.; Njoroge, J.M.; Miller, J.L.; Gladwin, M.T.; Schechter, A.N. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 231–239.
255. Unpublished results

Molecular modeling as a promising tool to study dendrimer prodrugs delivery

Jeanine Giarolla *, Daniela G. Rando, Kerly F.M. Pasqualoto, Márcio H. Zaim, Elizabeth I. Ferreira

LAPEN, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (USP), SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2009

Received in revised form 6 September 2009

Accepted 27 September 2009

Available online 1 October 2009

Keywords:

Molecular modeling

Chagas' disease

Leishmaniasis

Dendrimer prodrugs

ABSTRACT

Molecular modeling methodologies were applied to perform preliminary studies concerning the release of active agents from potentially antichagasic and antileishmanial dendrimer prodrugs. The dendrimer was designed having *myo*-inositol as a core, L-malic acid as a spacer group, and hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), 3-hydroxyflavone or quercetin, as active compounds. Each dendrimer presented a particular behavior concerning to the following investigated properties: spatial hindrance, map of electrostatic potential (MEP), and the lowest unoccupied molecular orbital energy (E_{LUMO}). Additionally, the findings suggested that the carbonyl group next to the active agent seems to be the most promising ester breaking point.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas' disease and leishmaniasis are important global problems of public health affecting millions of people even though they are considered neglected tropical diseases [1]. *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas' disease and it is transmitted to humans by blood-sucking triatomine insects, blood transfusion, congenital transmission [2], and, more recently, oral transmission [3]. Benznidazole and nifurtimox are the only available drugs, but are limited and frequently inappropriate for the chronic phase of the disease, besides provoking serious side-effects [4]. Leishmaniasis is caused by at least 20 different species of parasites of genus *Leishmania* spp. and is transmitted to mammals, including human beings, by infected female phlebotomine sandflies. Protozoa species and host response are factors that distinguish the kind of clinical manifestation of this disease [5,6]. Chemotherapy for leishmaniasis is also limited to some drugs whose administration is related to severe problems of toxicity and resistance. Occasionally, a parenteral intake is required. Both diseases are in urgent need for completely new drugs exhibiting improved activity and/or pharmacokinetic profile [7].

The nitrofurazone derivative, hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), has shown to be a promising drug candidate to treat Chagas' disease [8]. This compound exhibited better *in vitro* activity than benznidazole, and 4-fold lower toxicity than the corresponding lead, nitrofurazone. Additionally, flavonoids as quercetin and 3-

hydroxyflavone showed good *in vitro* activity against trypanosomes and leishmanias. Unfortunately, they were not active or presented lower *in vivo* activity against leishmaniasis than miltefosine, the standard drug in biological assays [9], probably due to pharmacokinetic problems.

Prodrug design is a molecular modification process usually employed to optimize drugs, mainly concerning to the pharmacokinetic properties [10]. For this very reason, this approach is attractive as an alternative to solve the problems associated to the compounds supra-mentioned regarding the increase of therapeutic effectiveness, decrease of toxicity and improving the physicochemical properties. Dendrimers can be useful as prodrug carrier by their unique features [11]. They are highly branched synthetic macromolecules with distinct three-dimensional structure, which are responsible for their nanoscale size, low polydispersity and high functionality [12]. Moreover, their size can be synthetically restricted by the controlled addition of their structural building blocks using identical fragments denominated dendron [13]. The first group containing a core substituted with the building blocks is known as first generation dendrimer. In this specific case, the dendrimers are constructed with the active compounds as the building blocks [14].

The highly organized structural arrangement has inspired the use of dendrimers in relevant scientific fields, such as pharmaceutical and medicinal chemistry [15] as well as in clinical diagnostic [13]. The release of the active compounds happens throughout chemical or enzymatic cleavage of hydrolytically labile bonds offering the opportunity for absorption to specific interfaces, better control over drug's release, and also slower diffusion [16].

Several studies have reported the application of molecular modeling techniques to explain the dendrimer's behavior [17–19]. In

* Corresponding author. Address: LAPEN, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (USP), Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. Tel./fax: +55 11 3726 4429.
E-mail address: jeanineg@usp.br (J. Giarolla).

the present work, molecular modeling methodologies were applied as a new approach to better understand the delivery of the branches, which are constituted with the core *myo*-inositol. They were designed having L-malic acid as a spacer group and NFOH, quercetin or 3-hydroxyflavone, respectively (Fig. 1), as active agents. *Myo*-inositol is a polyalcohol and, for this reason, fulfills the requirements of a core to the dendrimer growth. Moreover, it is an important cellular constituent involved in different biochemical pathways which could result in low immunogenicity [20].

These structures probably release the active agents by enzymatic action, more specifically through unspecific esterase action. These enzymes could act in two possible breaking points in the branches, which are pointed out in Fig. 1 as C1 and C2.

Preliminary studies, regarding dendrimers containing one, two or three dendrons were performed to acquire information considering the suitability of the two breaking points (C1 and C2) to undergo an enzymatic attack as well as to verify if there are some advantages against one another as first target.

2. Computational details

The 3D structure of each single branch dendron containing NFOH, 3-hydroxyflavone and quercetin, in their neutral forms, were constructed using the HyperChem 7.51 software [21]. The following crystallized structures retrieved from PDB were used as standard geometries for building up the 3-hydroxyflavone and quercetin models: 2goi (resolution 2.30 Å) [22], and 1e8W (resolution 2.50 Å) [23], respectively. The NFOH three-dimensional structure was constructed based on the crystallized structure of nitrofurazone, PDB entry code 1yki (resolution 1.70 Å) [24].

The energy minimization of each single branch dendron model was carried out employing MM+ force field (HyperChem 7.51 and MOLSIM 3.2 [25] programs), without any constraints. Partial atomic charges were calculated using the AM1 semiempirical method [26], also implemented in the HyperChem 7.51 program. The energy-minimized models were used as initial structures to perform molecular dynamics simulations (MDS) [200,000 steps; 1 fs size step; 300 K]. Trajectory files were recorded every 20 steps resulting

10,000 conformations for each model. The lowest energy conformation of each model was selected from MDS and the electrostatic potential charges (ChelpG) were calculated using the *ab initio* method HF/3-21G* (Gaussian G03) [27]. The electrostatic potential (EP) of each model was mapped on a Connolly surface, using a color ramp from -8.5 to 8.5 e^{-2} . Negative values of EP (higher electronic density) are depicted in red while positive values are in blue (lower electronic density). The lowest unoccupied molecular orbital energy (E_{LUMO}) of each model was also computed and visualized using a range of -4.5 to 4.5 e^{-2} . The hydrogen bonds were also displayed using the ViewerLite 4.2 program [30]. In this software, they are shown between bond donors and acceptors on the entire molecule and both if there are no hydrogen atoms in the molecule, and if there are explicit hydrogen atoms. This parameter can indicate intramolecular interactions, which maintain the dendron structure more stable, and still provide some findings regarding intermolecular interactions with the aqueous medium solvent.

3. Results and discussion

In this approach the two carbonyl groups present in the structures were mainly focused. The first carbonyl group is closer to the *myo*-inositol moiety whereas the second one is near to the active agent (Fig. 1). The spatial disposition of these two groups was relevant to provide findings related to their availability in the presence of unspecific esterases. Furthermore, other important features such as the electronic density distribution represented by maps of electrostatic potential (MEP) and the E_{LUMO} on each carbon of these carbonyl moieties can also assist in verifying their susceptibility to a nucleophilic attack.

Table 1 illustrates the total energy (E_{total}), the root mean square deviation values (RMSd) between the lowest energy conformations retrieved from MDSs and the energy-minimized models, the number of hydrogen bonds (Hb) and the E_{LUMO} values of the dendrimers containing one, two and three dendrons with 3-hydroxyflavone, quercetin and NFOH, respectively. The E_{total} corresponds to the sum of the all energy contributions within each structure. As more negative is the E_{total} value more energetically favorable is the

Fig. 1. Schematic representation of dendrimers designed having *myo*-inositol as a core, L-malic acid as a spacer and the active agents (3-hydroxyflavone, quercetin, and NFOH) as a dendron. The skeleton of the structures containing one, two and three dendrons are also presented.

Table 1

Parameters related to the dendrimer containing one, two and three dendrons with 3-hydroxyflavone, quercetin and NFOH.

Dendrimer	E_{total} (kcal/mol)	RMSd (Å)	Number of H bonds	E_{LUMO} (kcal/mol)
<i>One dendron</i>				
3-Hydroxyflavone	−16.76	0.29	2	1.13
Quercetin	−92.73	0.33	1	1.06
NFOH	−53.29	0.26	–	−0.28
<i>Two dendrons</i>				
3-Hydroxyflavone	16.00	1.48	2	0.08
Quercetin	−110.48	1.34	4	0.64
NFOH	−116.15	0.52	5	−0.37
<i>Three dendrons</i>				
3-Hydroxyflavone	0.94	0.34	4	0.51
Quercetin	−164.76	0.86	5	0.48
NFOH	−218.11	0.40	11	−0.69

system. RMSd value is the overlay of the 3D structures by minimizing the distance between the corresponding atoms [21]. Considering systems having a large number of atoms, the structural integrity is maintained when the RMSd value is lower than 1.5 Å after a MDS procedure [28]. Regarding Table 1, all investigated molecules maintained their structural integrity.

The dendrimers designed with two and three dendrons containing 3-hydroxyflavone were not considered in this work because

they presented positive E_{total} values (16 and 0.94 kcal/mol, respectively). Otherwise, the sets containing quercetin and NFOH were energetically favorable. Additionally, the dendrimer containing NFOH presented the lowest E_{total} values, except to the system having one dendron, probably because it did not present any intramolecular interactions (hydrogen bonds). The presence of a large number of hydrogen bonds (Hb) in this set possibly contributed to the stability of these models. The same behavior was observed to the dendrimer designed with quercetin in which there is a progressive presence of the intramolecular interactions between the dendrons (1, 4 and 5 Hb to one, two and three dendrons, respectively).

The E_{LUMO} translates the capability of a system in accept or donate electron pairs. As lower is the E_{LUMO} value higher is the ability of a system to act as an electrons acceptor [29]. In this context, the NFOH set showed lower values of E_{LUMO} when compared to the similar quercetin set (Table 1).

The resulting color MEP and LUMO representation to one dendron containing 3-hydroxyflavone, quercetin, and NFOH are presented in Fig. 2. The carbonyl groups are also pointed out.

The dendron having 3-hydroxyflavone presented two Hb, as indicated in Table 1, both involving the *myo*-inositol and the α -malic acid portions (2.29 and 3.00 Å, respectively). These intramolecular interactions may probably impair an enzymatic approach involving this dendrimer region, but the resulting conformer presents a smaller spatial hindrance at the carbonyl group near to

Fig. 2. Visualization of the lowest energy conformation of a single branch dendron containing (1) 3-hydroxyflavone, (2) quercetin, and (3) NFOH retrieved from MDS. The intramolecular Hb (as green lines) and the CPK models are also presented (ViewerLite 4.2). MEPs are represented using a color range from -8.5 (intense red) to 8.5 (intense blue) e^{-2} , and LUMO distribution using a color range from -4.5 (intense red) to 4.5 (intense blue) e^{-2} (GaussView 3.0) [27]. The carbon atoms are in gray, oxygen in red, nitrogen in blue and hydrogen atoms are in white. The breaking points are indicated as white/black arrows. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the active agent, suggesting that, at least under a conformational point of view, this carbonyl group is more suitable to an enzymatic attack.

The LUMO distribution can only be verified over the carbonyl moiety closer to the active agent, suggesting this region as more favorable to a nucleophilic attack, corroborating the conformational results.

Although the MEP analysis reveals that the carbonyl group closer to the *myo*-inositol moiety presented a little bit lower electronic density, this is not significant when compared to the carbonyl group closer to the 3-hydroxyflavone. Then, taking into account all the findings, the most favorable breaking point in the single branch containing 3-hydroxyflavone is probably the carbonyl region near the active compound.

Fig. 3. Visualization of the lowest energy conformation retrieved from MDS for the dendrimers designed with two dendrons containing (1) quercetin and (2) NFOH. The intramolecular Hb (as green lines) and the CPK models are also presented (ViewerLite 4.2). MEPs are represented using a color range from -8.5 (intense blue) e^{-2} , and LUMO distribution using a color range from -4.5 (intense red) to 4.5 (intense blue) e^{-2} (GaussView 3.0) [27]. The carbon atoms are in gray, oxygen in red, nitrogen in blue and hydrogen atoms are in white. The breaking points are indicated as white/black arrows. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Fig. 4. Visualization of the lowest energy conformation of the dendrimer designed with three dendrons with (1) quercetin, (2) NFOH retrieved from MDS. The intramolecular Hb (as green lines) and the CPK models are also presented (ViewerLite 4.2). MEPs are shown using a color range from -8.5 (intense red) to 8.5 (intense blue) e^{-2} , and LUMO distribution using a color range from -4.5 (intense red) to 4.5 (intense blue) e^{-2} (GaussView 3.0) [27]. The carbon atoms are in gray, oxygen in red, nitrogen in blue and hydrogen atoms are in white. The breaking points are indicated as black arrows. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The lowest energy conformation retrieved from MDS for the single dendron containing quercetin demonstrated one intramolecular Hb involving the *myo*-inositol and *L*-malic acid portion ($2.82 \text{ \AA}$) which can convert this area in an unfavorable site to enzymatic nucleophilic attack.

Additionally, the analysis regarding the LUMO distribution was in agreement to that assumption, showing the region more susceptible to an enzymatic action is possibly the carbonyl group near to quercetin. Otherwise, the MEP presented a smoothly lower electronic density visualized by green/blue (neutral/positive) color on

the carbonyl moiety next to *myo*-inositol. However, considering mainly the LUMO distribution and spatial hindrance parameter (CPK model), the ester breaking point in the dendrimer designed with quercetin seemly occur in the carbonyl moiety near to the active agent.

Differently of the previous observations, there is no Hb in the dendrimer containing one dendron linked to the NFOH (Fig. 2). The CPK model showed the carbonyl group closer to the active agent as the most favorable to an enzymatic approximation. Moreover, the color MEP showed a region with lower electronic density

(green/blue color) next to *myo*-inositol. Both carbonyl groups did not present LUMO distribution next to them. Taking all that into account, the most favorable breaking point in the single branch containing NFOH is probably the carbonyl moiety next to the active agent as in the case of the other dendrons containing quercetin and 3-hydroxyflavone.

The lowest energy conformation from MDS found for the dendrimer designed with two dendrons containing quercetin had four intramolecular Hbs; two involving *myo*-inositol and L-malic acid (2.26, 2.37 Å), and two involving L-malic acid and quercetin (2.59, 3.13 Å) (Fig. 3). As already notice, the intramolecular interactions may interfere with the enzymatic access to the carbonyl group next to the dendrimer core. The CPK model corroborates this statement, showing the carbonyl moiety closer to the active agent as a more favorable breaking point. Furthermore, the same group presented lower electronic density in the MEP (green/blue color). Also, the LUMO distribution was on the carbonyl group near to quercetin. It is noteworthy that the LUMO distribution was the same found for the respective dendrimer designed having one dendron. Regarding all the findings, the ester breaking point of this dendrimer occurs probably at the carbonyl group closer to the active agent.

The dendrimer with two dendrons containing NFOH presents five intramolecular Hb (2.58 and 2.98 Å, involving the spacer and NFOH; 2.68, 2.71, and 3.14 Å between the core and spacer) (Fig. 3), which probably contributed to the spatial arrangement adopted by this structure. The CPK model showed the carbonyl group next to *myo*-inositol as the most promising to an enzymatic approximation. In addition, the MEP region on the carbonyl group next to *myo*-inositol also represented a lower electronic density (green/blue color) indicating this moiety as a potential area to suffer a nucleophilic attack. Both L-malic acid and the carbonyl moieties did not present LUMO distribution next to them. However, regarding mainly the spatial hindrance and the color MEP findings, the most favorable breaking point in the dendrimer containing NFOH is possibly the carbonyl region next to the dendrimer core.

The CPK models as well as the MEP and LUMO distributions found for the dendrimers containing three dendrons with quercetin and NFOH retrieved from MDSs are presented in Fig. 4. The dendrimer containing quercetin showed five intramolecular Hb (2.67, 2.73, 2.80, 3.03, and 3.08 Å), which are related to its spatial arrangement. A smaller spatial hindrance can be verified in the carbonyl moiety closer to the active agent, according to the CPK representation. The MEP property showed the same carbonyl group as a promising target to a nucleophilic action by an unspecific esterase due to its lower electronic density (green/blue color). Additionally, the LUMO distribution was in agreement to that assumption. Thus, the carbonyl moiety more suitable to an enzymatic action seems to be that near to quercetin.

The dendrimer containing NFOH showed eleven intramolecular Hbs (2.15, 2.67, 2.73, 2.73, 2.75, 2.76, 2.82, 2.82, 3.10, 3.18, and 3.18 Å). The CPK model indicated the carbonyl group near to the active agent as more available to an enzymatic approximation. Conversely, a region having neutral/positive electronic density (green/blue color) closer to the *myo*-inositol was verified by the color MEP. No LUMO distribution was observed over both carbonyl groups of the spacer, as expected, but only over the active agent. Regarding a better spatial availability, the carbonyl group next to

the active agent could be a more susceptible target to an ester cleavage by enzymatic action.

This molecular modeling approach considering some aspects related to the structural integrity and hydrolysis of potentially antichagasic and antileishmanial dendrimer prodrugs was relevant as a preliminary evaluation to direct the synthesis of the most promising systems and predict their behavior in the biological environment. The synthesis of the dendrimer prodrugs containing NFOH, 3-hydroxyflavone and quercetin are being performed and their experimental release evaluation from dendrons will also be carried out to validate the presented results.

Acknowledgment

The authors are grateful to FAPESP (01/01192-3, 06/00116-5, 07/59416-0, 08/54211-4 and 07/5461-0) and CNPq for the financial support, and to the Chem21 Group, Inc., for the MOLSIM 3.2 academic license.

References

- [1] M.C. Chung, E.I. Ferreira, J.L. Santos, J. Giarolla, D.G. Rando, A.E. Almeida, P.L. Bosquesi, R.F. Menegon, L. Blau, *Molecules* 13 (2008) 616.
- [2] A. Moncayo, M.I. Orthis Yanine, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100 (2006) 663.
- [3] N. Yoshida, *Parasitol. Int.* 57 (2008) 105.
- [4] J.D. Maya, B.K. Cassels, P. Iturriaga-Vásquez, J. Ferreira, M. Faúndez, N. Galanti, A. Ferreira, A. Morello, *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 146 (2007) 601.
- [5] S.L. Croft, S. Sundar, A.H. Fairlamb, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 111.
- [6] T.V. Piscopo, C.M. Azzopardi, *Prostgrad. Med. J.* 83 (2007) 649.
- [7] S. Nwaka, A. Hudson, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5 (2006) 941.
- [8] M.C. Chung, R.V.C. Guido, T.F. Martinelli, M.F. Gonçalves, M.C. Polli, K.C.A. Botelho, E.A. Varanda, W. Colli, M.T.M. Miranda, E.I. Ferreira, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 4779.
- [9] D. Tasdemir, M. Kaiser, R. Brun, V. Yardley, T.J. Schmidt, F. Tosun, P. Ruedi, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006) 1352.
- [10] M.C. Chung, A.T.A. Silva, L.F. Castro, V.C. Guido, J.C. Nassute, E.I. Ferreira, *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 41 (2005) 155.
- [11] A.D. Emanuele, D. Attwood, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 57 (2005) 2147.
- [12] S. Servenson, D.A. Tomalia, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 2106.
- [13] C.C. Lee, J.A. MacKay, J.M. Fréchet, F.C. Szoka, *Nat. Biotechnol.* 23 (2005) 1517.
- [14] E.I. Ferreira, J. Giarolla, Patent 018070068714, 2007 (under analysis).
- [15] H. Yang, W.J. Kao, J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 17 (2006) 3.
- [16] Y. Cheng, Z. Xu, M. Ma, T. Xu, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 123.
- [17] J.T. Bosko, R. Prakash, *J. Chem. Phys.* 128 (2008) 034902.
- [18] P. Brocorens, R. Lazzaroni, J.L. Brédas, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 9218.
- [19] A.A. Ivanov, K.A. Jacobson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 4312.
- [20] M.V. Almeida, A.D. Silva, M.V.N. Souza, A.A.A. Benício, *Quim. Nova* 26 (2003) 105.
- [21] HyperChem Program Release 7 for Windows, Hypercube, Inc., Gainesville, FL, 2002.
- [22] H. Zheng, A. Mandal, I.A. Shumilin, M. Chruszcz, J.C. Herr, W. Minor, in press.
- [23] E.H. Walker, M.E. Pacold, O. Perisic, L. Stephens, P.T. Hawkins, M.P. Wvmann, R.L. Williams, *Mol. Cell* 6 (2000) 909.
- [24] P.R. Race, A.L. Lovering, R.M. Green, A. Ossor, S.A. White, P.F. Searle, C.J. Wrighton, E.I. Hyde, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 13256.
- [25] D. Doherty, MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software – User's Guide, version 3.2, The Chem21 Group Inc., Lake Forest, IL, 1997.
- [26] M.J.S. Dewar, E.F. Healy, A.J. Holder, Y.C. Yuan, *J. Comp. Chem.* 11 (1990) 541.
- [27] Gaussian 03W for Windows, version 6, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 1995–2003.
- [28] J.S. Tokarski, A.J. Hopfinger, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 37 (1997) 779.
- [29] IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry, Compendium of Chemical Terminology, second ed. (the "Gold Book"). Compiled by A.D. McNaught, A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997. XML on-line corrected version: <<http://goldbook.iupac.org>> created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata, updates compiled by A. Jenkins, ISBN 0-9678550-9-8. doi: 10.1351/goldbook, 2006.
- [30] ViewerLite 4.2, Accelrys Inc., 2001.

Chalcones and *N*-acylhydrazones: direct analogues? Exploratory data analysis applied to potential novel antileishmanial agents

Daniela Gonçalves Rando*, Jeanine Giarolla, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto,
Elizabeth Igne Ferreira

*Laboratory of design and synthesis of chemotherapeutical agents potentially active against tropical diseases – LAPEN,
Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo*

Leishmaniasis is an important health and social problem for which there is limited effective therapy. Chalcones and *N*-acylhydrazones have been studied as promising antileishmanial agents in enzymatic inhibition and *in vitro* assays. Since these chemical classes of compounds also resemble each other structurally, it would be useful to investigate whether they share direct analogy. Exploratory data analysis was applied to a library of chalcones and nitrated *N*-acylhydrazones assayed against *Leishmania donovani* to investigate their similarity. Under the conditions applied in the present study, the two classes did not present functional or structural analogy.

Uniterms: Chalcones. *N*-acylhydrazones. Antileishmanial agents. Leishmaniasis. Chemometrics.

As leishmanioses são importantes problemas sociais e de saúde pública para os quais a terapia farmacológica atual é, ainda, limitada. Chalconas e *N*-acilidrazonas têm sido estudadas como promissoras agentes leishmanicidas tanto em ensaios *in vitro* quanto em ensaios de inibição de cisteino-proteases importantes para o parasito. Uma vez que estas classes de compostos apresentam similaridade bidimensional, seria interessante estudar se estes compostos guardariam relação de analogia direta entre si. Análise exploratória de dados foi aplicada, então, à biblioteca de chalconas e *N*-acilidrazonas nitradas ensaiadas contra *Leishmania donovani* para investigar suas relações de similaridade. Os resultados mostraram que, ao menos sob as condições consideradas neste estudo, as duas classes de compostos não apresentam analogia estrutural e funcional simultaneamente, embora elas apresentem alguma similaridade estrutural.

Unitermos: Chalconas. *N*-acilidrazonas. Agentes leishmanicidas. Leishmaniose. Quimiometria.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is a neglected disease that affects millions of individuals worldwide causing significant morbidity and mortality, particularly in developing countries. Available drug therapy, however, is limited and frequently inappropriate (Chung *et al.*, 2008). Of the 1393 new drugs marketed between 1975 and 1999, only 13 were targeted for tropical diseases (Trouiller *et al.*, 2002). In fact, the effective drugs are toxic and often require parenteral administration for long treatment courses, increasing the

chances of failure due to emergence of resistance (Croft, 2005). This scenario emphasizes the importance of the search for completely new active compounds.

Screening of natural products offers the promise of discovering new molecules with a unique structure, and both high activity and selectivity (Kayser *et al.*, 2003). Chalcones are natural 1,3-diarylpropenones which exhibit a broad spectrum of potential applications, including antiprotozoal activity (Nielsen *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001). This activity is likely derived from a cysteine protease inhibition mechanism. Cysteine proteases are key enzymes in many parasitic biochemical pathways and, therefore, constitute potential targets in the search for drugs against several tropical infectious diseases (McKerrow *et al.*, 1999; McKerrow, 1999). For these reasons, sets of chalcone analogues have also been tested as potential cysteine proteases inhibitors.

*Correspondence: D. G. Rando. Laboratório de planejamento e síntese de quimioterápicos potencialmente ativos contra endemias tropicais - LAPEN, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 Superior - Cidade Universitária - 05508900 - São Paulo - SP, Brasil. E-mail: dgrando@usp.br

Studies comparing the inhibitory effect of *N*-acylhydrazones and chalcones on well-known parasitic cysteine proteases, such as cruzain, falcipain, and trypanopain, have been conducted (Li *et al.*, 1995, 1996; Troeberg *et al.*, 2000;). Both classes of compounds present IC_{50} values in a micromolar range, suggesting that these compounds could be applied as prototypes in the development of new inhibitor agents. Since these chemical classes of compounds also resemble each other structurally, it would be interesting to verify whether they share direct analogy.

Direct analogues are defined as chemical entities which present, simultaneously, chemical and pharmacological similarities (Wermuth, 2006).

Structural and functional analogy between chalcones and *N*-acylhydrazones would bring some advantages in the search for new antileishmanial agents. 3D and 4D-QSAR studies applied to both chemical classes could be able to provide ligand-receptor interaction information, and a common pharmacophore. Those findings could be useful for designing new and more potent compounds, which accumulate the significant molecular features of both chalcones and *N*-acylhydrazones.

Several chemometric methods have broadened the arsenal of tools that can be applied to QSAR studies. Exploratory data analysis methods of Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) (Beebe *et al.*, 1998) number among these methods.

HCA is an important multivariate method whose primary purpose is to emphasize the clusters and patterns of the investigated data, displaying them as a dendrogram, which allows the visualization of the samples or variables in a 2D space. The distances between samples or variables are calculated and transformed into a similarity matrix whose elements correspond to the similarity indexes (Ferreira, 2002).

PCA however, is a data compression multivariate method based on correlation among variables. Its objective is to group correlated original independent variables or descriptors and replace them with a new set called principal components (PCs) onto which the data is projected. The PCs are completely uncorrelated and are built as a simple linear combination of original variables. Furthermore, the PCs contain most of the variability in the data set within a much smaller dimensional space (Ferreira, 2002).

Thus, in this study, an exploratory data analysis using the above-mentioned methods was applied to a set of ninety-four chalcones and nitrated *N*-acylhydrazones to verify if they indeed share **direct analogy**. This is fundamental to subsequent construction of 3D-QSAR models, to explaining their antileishmanial behavior and to finding a common pharmacophore, in order to design new parasitic

agents for this activity.

METHODOLOGY

A complete series of ninety-four compounds were investigated and are listed in Figure 1. The set encompasses forty-nine 5-nitroheterocyclic benzhydrazides, synthesized by Rando *et al.* (2008), and forty-five chalcone derivatives, which were selected from the work of Nielsen *et al.* (1998).

Biological activities were evaluated as the compounds *in vitro* concentration capable of inhibiting 50 percent of *Leishmania donovani* promastigote proliferation (IC_{50} , μ M) (Figure 1). The IC_{50} values were expressed in negative logarithmic units, pIC_{50} ($-\log IC_{50}$), and comprise the set of dependent variables.

The three-dimensional structures of each of the ninety-four compounds or ligands, in their neutral forms, were constructed employing the HyperChem 7 software (HyperChem, 2002). The crystallized structures of nitrofurazone and 2'-hydroxy-4''-dimethylamino-chalcone were retrieved from the Brookhaven Protein Data Bank (PDB entry code 1yki, resolution at 1.70 Å; Race *et al.*, 2005) and file ob1067.cif (resolution at 1.01 Å; Liu *et al.*, 2002), respectively, and were used as geometry references in the building up of all ligands. Crystallographic information of a nitrothiophene 2-carbaldehyde was retrieved from the file lh6379.cif (resolution at 1.18 Å; McBurney *et al.*, 2005) and also used as a reference particularly in the construction of the nitrothiophene ring moiety.

The energy minimization was carried out employing the HyperChem 7 MM+ force field without any restriction. The MOLSIM 3.2 program (Doherty, 1997) was also used for geometry optimization of each structure investigated. Partial atomic charges were calculated using the PM3 (Stewart, 1989) semi-empirical method, also implemented in the HyperChem program.

The structures modeled as described above were used as the initial structures in each molecular dynamics (MD) simulation (Van Gunsteren, Berendsen, 1990), which are employed to perform the conformational ensemble profile of each ligand (MOLSIM 3.2).

The MD simulation protocol included 100,000 steps, a step size of 0.001 ps (1fs), and a simulation temperature of 300 K. Trajectory files were recorded every 20 simulation steps to generate 5,000 conformations for each molecule. The lowest energy conformation was selected from MD simulation for each ligand and electrostatic partial atomic charges (ChelpG) were computed using the HF/6-31G* method, implemented in the Gaussian 03W program (Gaussian, 2003).

N-acylhydrazones

Chalcones

FURANS				THIOPHENES				Chalcones		
Code	Rgroups		IC ₅₀	Code	Rgroups		IC ₅₀	Code	Substituents	IC ₅₀
	Rpara	Rmeta	μM		Rpara	Rmeta	μM			μM
1/O	H	H	11.19	1/S	H	H	6.54	n-1	licochalcone	13
2/O	Cl	H	7.83	2/S	Cl	H	1.26	n-2	2-OCH ₃ -4,4'-OH	68
3/O	OMe	H	8.99	3/S	OMe	H	7.21	n-3	2-OCH ₃ -4,4'-OH-5-propyl	26
5/O	NH ₂	H	2.66	5/S	NH ₂	H	2.24	n-4	2-OCH ₃ -4,4'-OH-5-hexyl	9.7
6/O	OH	H	2.40	6/S	OH	H	0.89	n-5	2-OCH ₃ -3-methyl-4,4'-OH	22
7/O	Me	H	10.98	7/S	Me	H	4.49	n-6	2-OCH ₃ -4,4'-OH-5-methyl	39
8/O	CF ₃	H	8.86	8/S	CF ₃	H	0.82	n-38	3,5-OCH ₃ -4'-allyloxy	27
9/O	NO ₂	H	6.57	9/S	NO ₂	H	2.81	n-39	4-C ₆ H ₁₃ -3,5-OCH ₃ -4'-allyloxy	90
10/O	H	Cl	7.83	10/S	H	Cl	2.74	n-40	4-C ₆ H ₁₃ -3,5-OCH ₃ -4'-allyloxy	19
11/O	H	OMe	10.37	11/S	H	OMe	8.52	n-41	2'-OH-3,5-OCH ₃	3.8
12/O	H	N(Me) ₂	7.94	14/S	H	OH	2.75	n-42	3'-OH-3,5-OCH ₃	3.7
14/O	H	OH	10.17	15/S	H	Me	4.84	n-43	2-OH-2',3',4'-OCH ₃	9.3
15/O	H	Me	19.76	16/S	H	CF ₃	3.79	n-44	2',3',4',3,5-OCH ₃	8.3
16/O	H	CF ₃	10.39	17/S	H	NO ₂	2.78	n-45	3',2,4-OCH ₃	18
17/O	H	NO ₂	9.86	18/S	Cl	Cl	0.41	n-46	2'-Br-2,4-OCH ₃	14
18/O	Cl	Cl	1.68	19/S	F	F	2.15	n-47	3'-Br-2,4-OCH ₃	16
19/O	F	F	9.49	22/S	F	Cl	1.92	n-48	2',4'-F-2,4-OCH ₃	26
22/O	F	Cl	6.42	23/S	NO ₂	OMe	2.00	n-49	2',4'-OCH ₃ , 2,4-F	27
23/O	NO ₂	OMe	7.39	24/S	NO ₂	OH	5.45	n-50	2',3',4'-OCH ₃ -2,4-Cl	6.3
24/O	NO ₂	OH	9.90	25/S	OMe	NH ₂	4.69	n-51	2',4'-OCH ₃ , 3,4-F	16
25/O	OMe	NH ₂	16.43	28/S	Me	NH ₂	2.24	n-52	2',5'-OCH ₃ -2,4-Cl	7.8
26/O	OH	NH ₂	26.98	29/S	Me	OH	2.30	n-53	2',4',3,4-OH	66
28/O	Me	NH ₂	0.62	30/S	Me	OMe	2.19	n-54	4',4-OCH ₃	106
30/O	Me	OMe	8.90	32/S	Cl	SO ₂ NH ₂	8.06	n-55	2',4',4-OH-3-OCH ₃	16
32/O	Cl	SO ₂ NH ₂	38.45					n-56	3,4,5-OCH ₃ -4'-allyloxy	41
								n-58	2,5-OCH ₃ -4'-allyloxy	73
								n-59	3,4-OCH ₃ -4'-allyloxy	60
								n-60	2,4,2'-OCH ₃	16
								n-64	2,4-OCH ₃	15
								n-65	2,6-OCH ₃ -4'-OC ₄ H ₉	104
								n-66	2,6-OCH ₃ -4'-allyloxy	81
								n-67	2,3-OCH ₃ -4'-allyloxy	49
								n-68	3,5-OCH ₃ -4'-OC ₄ H ₉	35
								n-69	2,4-OCH ₃ -2'-OH	35
								n-70	2,4-OCH ₃ -2'-allyloxy	5.0
								n-71	2,5,4'-allyloxy	38
								n-72	4',4-OH	83
								n-75	3,5-OCH ₃ -4'-OH	12
								n-76	2,4,6-OCH ₃ -4'-OH	106
								n-77	4'-OH	16
								n-78	2,5-OCH ₃ -4'-OH	23
								n-79	2,4,5-OCH ₃ -4'-OH	16
								n-80	2,4-OCH ₃ -4'-OH	48
								n-81	2-OCH ₃ -4-OH-4'-N(CH ₃) ₂	49
								n-82	4-N(CH ₃) ₂ -4'-OH	79

FIGURE 1 - Structures and actions of the investigated set of chalcones and nitrated *N*-acylhydrazones

The independent variables or descriptors, related to thermodynamic, steric, electronic, hydrophobic and structural contributions, were calculated employing specific software such as MOLSIM 3.2 (Doherty, 1997), Marvin Beans (MarvinBeans, 2007), Gaussian 03W (Gaussian, 2003), Pallas 3.0 (Pallas, 1995), and HyperChem 7 (HyperChem, 2002). The total data matrix contains 94 rows (number of samples or compounds) and 48 columns, including biological activity. The samples were randomized before performing the exploratory data analysis.

HCA and PCA (Beebe, 1998) were carried out using the Pirouette 3.11 program (Pirouette, 2003). The autoscaling procedure was applied as a preprocessing method,

meaning that each element of data matrix was subtracted by its mean column and divided by the standard deviation of its column before the analysis. After screening using different linkage methods, HCA studies were performed considering the centroid linkage method. The PCA formalism was run up to seven factors.

RESULTS AND DISCUSSION

Table I shows the complete list of independent variables calculated for the compounds together with their descriptions and other relevant information.

The thermodynamic descriptors found for the lowest

TABLE I - Descriptors calculated for the set studied

Descriptor	Unity	Nature	Description	Software
EL_{stretch}	kcal/mol	Thermodynamics	Stretching energy contribution	<i>MOLSIM</i>
EL_{bend}	kcal/mol	Thermodynamics	Bending energy contribution	
EL_{tors}	kcal/mol	Thermodynamics	Torsional energy contribution	
EL_{vdw}	kcal/mol	Thermodynamics	Van der Waals energy contribution	
EL_{charge}	kcal/mol	Thermodynamics	Electrostatic energy contribution	
EL_{hb}	kcal/mol	Thermodynamics	Hydrogen bound energy contribution	
EL₁₄	kcal/mol	Thermodynamics	Lennard-Jones energy contribution	
EL_{solvate}	kcal/mol	Thermodynamics	Solvation energy contribution	
EL_{tot}	kcal/mol	Thermodynamics	Total ligand energy (sum of all energy contributions)	
E_{lumo}	kcal/mol	Electronic	LUMO frontier orbital energy	<i>Gaussian 03W for Windows</i>
E_{homo}	kcal/mol	Electronic	HOMO frontier orbital energy	
GAP	kcal/mol	Electronic	Difference between HOMO and LUMO energies (H-L)	
ChelpG 1 (EPS)	---	Electronic	Electrostatic potential charges under carbonyl carbon calculated by ChelpG	
ChelpG 2 (EPS)	---	Electronic	Electrostatic potential charges under carbonyl oxygen calculated by ChelpG	
ChelpG 3 (EPS)	---	Electronic	Electrostatic potential charges under β-carbon (chalcones) or C=N carbon (N-acylhydrazones) calculated by ChelpG	
ChelpG 4 (EPS)	---	Electronic	Rate between electrostatic potential charges calculated for the carbonyl carbons and Cβ (chalcones) or C=N carbon (N-acylhydrazones).	
μ_x	debye	Electronic	X component of dipole moment.	
μ_y	debye	Electronic	Y component of dipole moment.	<i>HyperChem Program Release 7 for Windows</i>
μ_z	debye	Electronic	Z component of dipole moment.	
μ_{tot}	debye	Electronic	Total dipole moment.	
ClogP_{Hyper}	---	Hydrophobic	Calculated partition coefficient (water/ <i>n</i> -octanol)	
Volume	Å ³	Steric	Total volume	
MR	Å ³	Steric Hydrophobic	Molar refractivity.	
α	Å ³	Steric/Electronic	Polarizability	
Mass	uma	Steric	Atomic mass	
SAapprox	Å ²	Steric	Approximated surface area	<i>Pallas 3.0</i>
SAgrid	Å ²	Steric	Surface area obtained by GRID method	
ClogP_{Pallas}	---	Hydrophobic	Calculated partition coefficient (water/ <i>n</i> -octanol)	
LogD 2.0	---	Hydrophobic	Apparent partition coefficient in different pH systems (2.0, 7.0 and 9.0).	
LogD 7.0	---	Hydrophobic		
LogD 9.0	---	Hydrophobic		

TABLE I - Descriptors calculated for the set studied (cont.)

I_{balaban}	---	Topologic	Index which describes the averaged distance sum connectivity.	
H_{Donor}	---	Topologic	Number of hydrogen bond acceptors and donor sites in structures.	
H_{Accep}	---	Topologic		
Dreiding	---	Steric	Dreiding energy (conformers stability)	
Hind 1	---	Steric	Steric hindrance under carbonyl carbon.	
Hind 2	---	Steric	Steric hindrance under β -carbon (chalcones) or under C=N carbon, C=N (N-acylhydrazones).	
SA_{VDW}	$\text{\AA}^2$	Steric	Van der Waals surface area.	
$SA_{\text{SolvAccess}}$	$\text{\AA}^2$	Steric	Solvent access surface area.	MarvinBeans
PSA	$\text{\AA}^2$	Steric	Polar surface area.	
D1	$\text{\AA}$	Structural	Distance d1	
D2	$\text{\AA}$	Structural	Distance d2	
D3	$\text{\AA}$	Structural	Distance d3	
D4	$\text{\AA}$	Structural	Distance d4	
A1	degrees	Structural	Angle a1	
A2	degrees	Structural	Angle a2	
A3	degrees	Structural	Angle a3	

Referred distances and angles:

energy conformation from MD simulation of each ligand included the following energy contributions: stretching energy (EL_{stretch}), bending energy (EL_{bend}), torsional energy (EL_{tors}), Lennard-Jones or 1,4 interactions energy ($EL_{1,4}$), electrostatic energy (EL_{el}), van der Waals energy (EL_{vdW}), hydrogen bonding energy (EL_{Hb}), and solvation energy (EL_{solv}). The total energy of each ligand (EL_{tot}) corresponds to the summation of all these energy contributions.

The correlation between the biological data (pIC_{50} values) and the calculated independent variables or descriptors was visualized through the respective scatter plots. This is an important step in exploratory data analysis for acquiring reliable information about the dataset behavior. Correlation coefficients were not employed as a cutoff

factor because other types of correlation, besides the linear type, must also be considered in similarity studies.

The D_4 parameter, for instance, describes the total distance between the two aromatic rings in both subsets of compounds. The D_4 range values found for the nitrated N-acylhydrazones and chalcone derivatives were 4.80 to 4.90 $\text{\AA}$ and 4.90 to 5.20 $\text{\AA}$, respectively. These distance ranges suggest that, although the intermediary chain of N-acylhydrazones possesses four atoms, its 3D models are comparable to those of the chalcone derivatives, which have only three atoms in their intermediary chain.

Conversely, the scatter plot pIC_{50} versus D_4 indicates that the related structural similarity does not translate to functional similarity (Figure 2).

FIGURE 2 - Scatter plots of biological activity (pIC_{50}) versus structural descriptors.

Nitrated *N*-acylhydrazones presents a narrow range of D_4 values but a significant pIC_{50} value range. This indicates that factors other than D_4 are interfering with the biological action of these compounds. Similar behavior was also verified for the other distances and angles measured, particularly the D_2 , A_1 and A_2 descriptors (Figure 2 and Table II).

The visual inspection of the biological activity versus calculated descriptor scatter plots was also applied as a filter for selecting the independent variables that would be used to perform HCA and PCA. Concerning scatter plot behavior, the independent variables can be classified as shown in Table III.

Among the forty-seven calculated descriptors, thirteen (*Ehb*, *Ehomo*, *ChelpG 4*, *D1*, *D2*, *D3*, *A1*, *A2*, *A3*, *H_{Donor}*, *Dreiding*, *Hind 1*, *Hind 2*) were practically constant and did not present significant variability with the

TABLE II - Topological and structural parameters calculated for the investigated compounds

Descriptor	Chalcones	<i>N</i> -acylhydrazones
D_1	1.40 – 1.48	1.36
D_2	1.33-1.42	1.37
D_3	1.32-1.40	1.26
D_4	4.90-5.20	4.80-4.90
A_1	118.9-144.5	119.9-120.1
A_2	123.8-137.4	116.7-117.3
A_3	118.7-131.7	118.5

pIC_{50} values. Moreover, six parameters (*ELstrech*, *Elumo*, *GAP*, *CLogP_{Hyper}*, *D4*, *PSA*) were grouped in their scatter plots, as opposed to showing a regular dispersion behavior, and were also not considered for further analysis. Thus,

TABLE III - Descriptor classification regarding tendency on scatter plots versus pIC_{50} values

TENDENCY OF pIC_{50} X DESCRIPTOR				
HIGH		LOW		MODERATE
EL_{bend}	μ_{tot}	EL_{strech}	D_4	EL_{solvat}
EL_{14}	Volume	EL_{hb}	A_1	$ClogP_{Pallas}$
EL_{tot}	MR	E_{lumo}	A_2	$LogD_{2,0}$
EL_{tors}	α	E_{homo}	A_3	$LogD_{7,0}$
EL_{vdw}	Mass	<i>GAP</i>	H_{Donor}	$LogD_{9,0}$
EL_{charge}	SA_{aprox}	<i>ChelpG 4</i>	<i>Dreiding</i>	μ_y
<i>ChelpG 1</i>	SA_{GRID}	$ClogP_{Hyper}$	<i>Hind 1</i>	H_{Accep}
<i>ChelpG 2</i>	$I_{Balaban}$	D_1	<i>Hind 2</i>	
<i>ChelpG 3</i>	SA_{vdw}	D_2	<i>PSA</i>	
μ_x μ_z	$SA_{solventaccess}$	D_3

FIGURE 3 - Preliminary PCA and HCA of the investigated set of compounds.

twenty-eight descriptors, which presented good or moderate correlation with biological activity, were employed in the exploratory data analysis (Table III). Volume and atomic mass were excluded from the analysis because they were not considered very expressive.

Preliminary HCA displayed chalcones and *N*-acylhydrazones grouped in two different main sub-clusters: *I*, which comprises exclusively nitrated *N*-acylhydrazones, and *II* comprising only chalcones, as presented in Figure 3. The similarity index between the sub-clusters *I* and *II* is 0.617 (70 selected descendants), suggesting low similarity. Additionally, sub-cluster *III* is composed of chalcone derivatives that are significantly different from the chalcone derivatives grouped in sub-cluster *II*. Moreover, regarding the PCA 3D-diagram, *N*-acylhydrazones are mainly distributed in the PC2 and PC3 spaces whereas chalcones can be found in all factors (PC1, PC2 and PC3 space), indicating distinct behavior among the compounds of this subset.

The PCA scores plot (Figure 3) also reveals three chalcone derivatives (n-53, n-72 and n-77) that possibly differ from the others. These three compounds could be acting as outliers interfering with the overall dataset behavior and leading to miscalculations. A 2D outlier diagnosis plot was therefore constructed to confirm this suspicion (Figure 4).

Considering the outlier diagram (sample residual versus Mahalanobis distance), samples falling outside

FIGURE 4 - Outlier diagram plot.

one or both of the thresholds are potential outliers. The sample residual threshold is based on a 95% probability limit (Pirouette, 2006), thus 5% of *normal* samples would be expected to fall outside this cutoff. For this reason, samples slightly exceeding only one threshold may be normal. However, samples lying either significantly beyond one threshold, or beyond both, are more likely to be outliers. Accordingly, only compound n-53 can be considered an outlier. In addition, another compound can also be identified as a potential outlier, namely, 32/S.

* Similarity indexes calculated for the seventy compounds grouped in the sub-clusters *I* (39 descendants) and *II* (31 descendants) (see Figure 3).

After the exclusion of compounds n-53 and 32/S individually and, later, at the same time, HCA procedures were carried out and the similarity indexes between the previous sub-clusters **I** and **II** were computed and evaluated*. When compound 32/S was individually eliminated, the similarity index obtained (0.618) was identical to that obtained before the exclusions (0.617). Nevertheless, when only compound n-53 was excluded, the similarity index diminished from 0.617 to 0.464, indicating that n-53 interferes significantly in the behavior of the chalcone derivatives. A similar result was found when both compounds n-53 and 32/S were excluded (0.460). This finding suggests that compound n-53 has greater impact on the overall set behavior than compound 32/S, and it should be considered as the only outlier.

Optimization of the HCA and PCA procedures was performed by removing just compound n-53. The HCA results are shown in Figure 5. The new dendrogram reveals two major clusters. The first is composed of the sub-clusters **I**, **II**, **III**, **IV**, **V**, and **VI**, whereas the second was called cluster **VII** and is distinct from the rest of the investigated data. Sub-cluster **II** corresponds to the *N*-acylhydrazones main group while sub-cluster **III** represents the chalcones main group. As previously mentioned, the similarity index between **II** and **III** was 0.464 as shown in Figure 5.

FIGURE 5 - Optimized dendrogram acquired after n-53 exclusion.

Sub-cluster **I** consists of seven *N*-acylhydrazones, containing more than one nitro group in its molecular structures (9/O, 9/S, 17/S, 23/O, 23/S, 24/O, and 24/S). The sub-clusters **IV** and **V** comprise chalcone derivatives that differ substantially from the chalcones of sub-cluster **III**. Finally, the dendrogram also revealed that compounds 32/O and 32/S did not share any kind of similarity neither

with chalcones nor with the other nitrated *N*-acylhydrazones, being classified as a distinct sub-cluster (**VI**). These compounds possess a sulfonylamide group in their molecular structures. This chemical group can attribute completely different physicochemical features to the structures, such as higher hydrophilic and ionization potential properties, which could be responsible for the distinct behavior of these ligands compared to the other ligands of the investigated set.

It is noteworthy that cluster **VII** is composed of one single ligand, n-65, which does not share any kind of similarity with the investigated set of compounds. Considering the calculated parameters, this derivative differs significantly from the others in terms of its torsional energy contribution (EL_{tors}) (see Table A, Supplementary Material).

PCA methodology without the n-53 compound better elucidated the HCA results. The PCA procedure was run up to a maximum of seven PCs because when more than seven PCs were computed the total variance explained remained practically unchanged.

As shown in Table IV, the first three PCs described 62% of the total variance explained. The relative importance of each descriptor for the respective factor or PC (loadings) is also listed in this table.

The 3D scores plot confirmed the classification of the investigated set into two main separate subsets: *N*-acylhydrazones and chalcones. This fact, which can be visualized in Figure 5, is much more evident after the outlier exclusion, corroborating the substantial impact of compound n-53 on the set behavior. Moreover, the partitioning of the investigated set also indicates that chalcones and *N*-acylhydrazones do not share direct analogy or, in other words, do not show both structural and functional similarity, at least regarding the methodology applied in this study.

The clusters found with the HCA technique can also be observed in PCA results. For instance, sub-clusters **I**, **II**, **VI**, and cluster **VII** (compound n-65) are clearly discernible in view 1 of the 3D scores plot.

Parallel analysis considering the loading plot as well as the score (Table B, Supplementary Material) and loadings (Table IV), the tables revealed that the nitrated *N*-acylhydrazones biological behavior depends chiefly on thermodynamic and electronic descriptors, such as total energy (EL_{tot}), bending energy (EL_{bend}), total dipole moment (μ_{tot}), and the number of acceptor hydrogen bonding sites (H_{Accep}).

It is important to consider that nitroderivatives can also exert their action by a nitro group reduction pathway (Orna, Mason, 1989), and this could be the mechanism highlighted in the methodologies applied here.

TABLE IV - Principal component analysis runs for 93 samples and 25 independent variables. The loadings of independent variables are listed below

	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7
Variance %	36.49	15.04	10.56	9.46	5.22	3.82	3.64
Cumulative variance	36.49	51.54	62.10	71.55	76.77	80.60	84.24
EL_{bend}	-0.07	0.34	0.11	-0.32	-0.07	0.26	0.28
EL_{tors}	0.04	0.33	-0.07	-0.01	-0.09	-0.26	-0.57
$EL_{1,4}$	0.10	-0.18	0.47	-0.13	0.00	-0.09	-0.21
EL_{vdW}	0.11	-0.09	0.00	0.22	0.25	0.68	-0.13
EL_{el}	-0.06	0.24	-0.41	0.09	0.12	0.16	0.33
EL_{solv}	0.26	-0.15	-0.15	-0.22	0.16	-0.08	-0.02
EL_{tot}	-0.09	0.22	0.41	-0.29	-0.02	0.04	0.02
ChelpG 1	0.05	0.18	-0.26	-0.39	0.17	0.12	-0.10
ChelpG 2	0.10	-0.06	0.14	0.50	0.06	-0.10	0.17
ChelpG 3	-0.01	0.28	-0.20	-0.10	0.24	-0.43	0.14
μ_x	0.06	-0.22	-0.06	-0.11	-0.48	-0.02	0.34
μ_y	0.02	0.29	0.06	0.29	0.22	-0.10	0.00
μ_z	0.01	-0.07	0.25	-0.18	0.57	0.11	-0.02
μ_{tot}	-0.18	0.24	0.20	0.30	0.06	-0.09	0.04
MR	0.29	0.19	0.03	-0.01	-0.10	0.11	0.02
α	0.30	0.18	0.01	-0.05	-0.04	0.08	0.04
SAGrid	0.30	0.13	0.04	0.02	-0.15	0.07	-0.03
ClogP_{Pallas}	0.32	-0.02	0.02	0.01	0.13	-0.09	0.13
LogD 2.0	0.29	-0.01	0.00	0.11	0.16	-0.15	0.19
LogD 7.0	0.32	-0.03	0.03	-0.01	0.11	-0.10	0.14
LogD 9.0	0.29	-0.02	0.14	-0.07	0.07	-0.13	0.18
$I_{balaban}$	0.18	0.02	-0.29	0.12	-0.07	0.11	-0.35
H_{Accep}	-0.22	0.31	0.16	0.10	-0.04	0.09	0.11
SA_{VDW}	0.29	0.18	0.05	0.03	-0.17	0.08	-0.13
$SA_{SolvAccess}$	0.20	0.28	0.19	0.10	-0.24	0.10	0.02

Non-nitrated *N*-acylhydrazones could be more suitable to demonstrate a common mechanism of action between the two classes of compounds investigated. However, as previously mentioned, a set of non-nitrated *N*-acylhydrazones assayed under the same biological conditions as the classes evaluated in this study were not available in the literature.

Nonetheless, if a second mechanism of action takes place and is similar to that of chalcones, descriptors of any other nature should be common to both classes.

Chalcones, on the other hand, presented a broader distribution in PCs coordinates than did *N*-acylhydrazones (see View 2, Figure 6). The van der Waals energy (EL_{vdW}) and electronic descriptors, such as dipole moment at the X coordinate (μ_x), and electrostatic potential partial atomic

charges at the carbonyl carbon (**ChelpG 1**) and oxygen (**ChelpG 2**), respectively, are related to chalcone biological behavior. These latter descriptors could indicate the importance of the carbonyl group to chalcone action and also support the cysteine protease inhibitory mechanism of action.

Interestingly, sub-cluster *V* of chalcones differs from the other chalcone derivatives by descriptors related to the molecular volume, such as van der Waals surface areas (SA_{VDW}), polarizability (α), and molar refractivity (**MR**). All compounds in this group presented bigger or more branched side chains (Figure 1). In fact, the Connolly surfaces of these compounds can present volume differences compared to the other unsubstituted chalcone analogues (sub-cluster *III*) (Figure 7).

- LI, R.; CHEN, X.; GONG, B.; SEIZER, P. M.; LI, Z.; DAVIDSON, E.; KURZBAN, G.; MILLER, R. E.; NUZUM, E. O.; MCKERROW, J. H.; FLETTERICK, R. J.; GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; KUNTZ, I. D.; COHEN, F. E.; KENYON, G. L. Structure-based design of parasitic protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, v.4, p.1421-1427, 1996.
- LI, R.; KENYON, G. L.; COHEN, F. E.; CHEN, X.; GONG, B.; DOMINGUEZ, J. N.; DAVIDSON, E.; KURZBAN, G.; MILLER, R. E.; NUZUM, E. O.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H. *In vitro* antimalarial activity of Chalcones and their derivatives. *J. Med. Chem.*, v.38, p.5031-5037, 1995.
- LIU, M.; WILAIRAT, P.; GO, M. L. Antimalarial alkoxyated and hydroxylated chalcones: structure-activity relationship analysis. *J. Med. Chem.*, v.44, p.4443-4452, 2001.
- LIU, Z.; FANG, Q.; YU, W.; XUE, G.; CAO, D.; JIANG, M. 2'-Hydroxy-4''-dimethylamino-chalcone. *Acta Crystallogr. C*, v.C58, p.o445-o446, 2002.
- MARVINBEANS, Version 4.1.8; Budapest: ChemAxon Ltd, 1998-2007. CD-Rom
- MCBURNEY, B.; CRUNDWELL, G.; UPDEGRAFF III, J. B.; ZELLERB, M.; HUNTERB, A. D. 5-Nitrothiophene-2-carbaldehyde. *Acta Crystallogr. E*, v.E61, p.o1221-o1222, 2005.
- MCKERROW J. H.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg. Med. Chem.*, v.7, p.639-644, 1999.
- MCKERROW, J. H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *Int. J. Parasitol.*, v.29, p.833-837, 1999.
- NIELSEN, S. F.; CHRISTENSEN, S. B.; CRUCIANI, G.; KHARAZMI, A.; LILJEFORS, T. Antileishmanial Chalcones: Statistical design, synthesis, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis. *J. Med. Chem.*, v.41, p.4819-4832, 1998.
- ORNA, M. V.; MASON, R. P. Correlation of kinetic parameters of nitroreductase enzymes with redox properties of nitroaromatic compounds. *J. Biol. Chem.*, v.264, p.12379-12384, 1989.
- PALLAS, version 3.0, Sedona: CompuDrug Chemistry Ltd, 1994-1995. CD-Rom
- PIROUETTE, version 3.11, Woodinville: Infometrix Inc., 1990-2003. CD-Rom
- RACE, P. R.; LOVERING, A. L.; GREEN, R. M.; OSSOR, A.; WHITE, S. A.; SEARLE, P. F.; WRIGHTON, C. J.; HYDE, E. I. Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone: reversed binding orientations in different redox states of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, v.280, p.13256-13264, 2005.
- RANDO, D. G.; AVERY, M. A.; TEKWANI, B. L.; KHAN, S. I.; FERREIRA, E. I. Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzylidene hydrazides. *Bioorg. Med. Chem.*, v.16, p.6724-6731, 2008.
- STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semi-empirical methods I-method. *J. Comput. Chem.*, v.10, p.209-220, 1989.
- TROEBERG, L.; CHEN, X.; FLAHERTY, T. M.; MORTY, R. E.; CHENG, M.; HUA, H.; SPRINGER, C.; MCKERROW, J. H.; KENYON, G. L.; LONSDALE-ECCLES, J. D.; COETZER, T. H. T.; COHEN, F. E. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured *Trypanosoma brucei brucei*. *Mol. Med.*, v.6, p.660-669, 2000.
- TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet*, v.359, p.2188-2194, 2002.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v.29, p.992-1023, 1990.
- WERMUTH, C. G. Similarity in drugs: reflections on analogue design. *Drug Discov. Today*, v.11, p.348-354, 2006.

Received for publication on 23rd July 2008

Accepted for publication on 16th October 2009

Synthesis Optimization of Hydroxymethylnitrofurazone, an Antichagasic Candidate, Using 3² Factorial Design

Gustavo H.G. Trossini^{*,a}, Jeanine Giarolla^a, Leandro de Rezende^b, Antonia T. do Amaral^b, Marcio H. Zaim^a, Roy E. Bruns^c and Elizabeth I. Ferreira^a

^aDepartment of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, 05508-800, Sao Paulo, SP, Brazil

^bDepartment of Fundamental Chemistry, Chemistry Institute, University of Sao Paulo, 05508-800, Sao Paulo, SP, Brazil

^cChemistry Institute, State University of Campinas, Campinas, SP, CP 6154, C.E.P. 13083-970, Brazil

Received October 08, 2009; Revised January 14, 2010; Accepted January 19, 2010

Abstract: Hydroxymethylnitrofurazone presents *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. The optimization of the synthesis of this compound was performed through a 3² factorial statistical design. Quadratic model produced the best response surface predicting a maximum yield (82%) close to the center design point with a seven hours reaction and a 1:1.5 (NF:K₂CO₃) ratio.

Keywords: Factorial design, synthesis optimization, hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), antichagasic candidate, response surface methodology.

INTRODUCTION

Chagas' disease, transmitted by *Trypanosoma cruzi*, is one of the most serious public health problems in Latin America. There are almost 16-18 million people infected with this protozoa and around 40 million people are at risk to contact this infection [1]. Current therapy is based on nifurtimox and benznidazole, which are mainly effective in the acute phase of the disease and may cause serious adverse side-effects [2-4]. Therefore, designing new and efficient drugs for this disease is of utmost importance. Nitrofurazone (NF), a 5-nitro-2-furfurilidenesemicarbazone, had its trypanomicidal activity demonstrated earlier [5], but has not been used in Chagas' disease chemotherapy. This activity was attributed to its capacity of inhibiting trypanothione reductase [6-8], an important enzyme that controls the metabolic stress of this parasite, besides a probable mechanism involving the inhibition of cruzain specific *T. cruzi* enzyme [9,10]. A new NF derivative, hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), was then synthesized in our laboratory and proved to be more active and four times less mutagenic than NF [8]. Recently, the inhibitory activity of those compounds was evaluated against cruzain from *T. cruzi*. The IC₅₀ (concentration required of 50% inhibition of cruzain) values for NF and NFOH were 22.83 ± 1.2 µM and 10.55 ± 0.81 µM, respectively [11].

Reactions of *N*-hydroxymethylation are very common in medicinal chemistry, mainly in prodrug design, in order to obtain water-soluble compounds, such as *N*-Mannich bases, [12]. The *N*-hydroxymethyl compounds can be obtained by the reaction between an acidic compound (amide, imide or

ureide) and formaldehyde in the absence of a primary or secondary acid amine (Scheme 1). The general reaction and its application to NFOH synthesis is depicted in Fig. (1).

Considering the urgency in obtaining new antichagasic drugs and taking into account the promising activity of NFOH, optimizing the synthesis of this compound is one of the most important steps for its further use in pre-clinical stages. In this context, factorial designs can be used for obtaining experimental information on the reactions that show significant influences on the yield and purity of the organic compounds [13, 14].

Generally, organic syntheses involve a number of variables and factorial design provides quantitative estimates of the effect of each variable. Moreover, it can be used to investigate which experimental factor is most important in affecting the experimental results. After being detected, it is possible to improve this factor(s) level, and discard unnecessary routes of synthetic approaches [13, 15]. Additionally, factorial design allows one to identify variable interactions (synergy), estimate errors and generate models to optimize organic synthesis. More recently, some papers have been emphasizing the applicability of multivariate statistical experimental design for synthesis optimization [16]. Santos and coworkers (2005) have executed a 3² factorial design to optimize the synthesis of *N*-carboxybutylchitosan [17]. Also, the optimization using fractional factorial design was applied successfully in the syntheses of di, tri and tetra fused pyridazinium cations [18]. In recent work, Fernandes and Felli applied 2² factorial design to evaluate the preparation of these esters through the substitution of alkyl bromides with carboxylate anion [19].

We have employed a 3² factorial design using time and nitrofurazone (NF):inorganic base (K₂CO₃) ratio in the development of a statistical model for obtaining a response

*Address correspondence to this author at the Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, 05508-800, Sao Paulo, SP, Brazil; Tel: +55-11-30913793; Fax: +55-11-38154418; E-mail: trossini@usp.br

Scheme 1. General reaction of hydroxymethylation.

Fig. (1). Scheme of the NFOH synthesis. (1) nitrofurazone and (2) hydroxymethylnitrofurazone.

surface so as to identify the factors that influence NFOH synthesis towards yield optimization (Table 1).

Table 1. Factor Levels Varied in the 3^2 Factorial Design

Factors	-1	0	+1
1 – Reaction time	3h	7h	11h
2 – NF:K ₂ CO ₃ ratio	1:1	1:1,5	1:2

RESULTS AND DISCUSSION

In order to optimize the hydroxymethylnitrofurazone (NFOH) yield, a 3^2 full factorial design was executed. The 2 factors analyzed were the reaction time and the nitrofurazone (NF): alkali (K₂CO₃) ratio as mentioned above. These factors

were selected on the bases of previous experiments carried out in our laboratory (unpublished results). The selected levels for the reaction time were 3h (-), 7h (0) and 11h (+), whereas the levels for NF:K₂CO₃ ratio were 1:1 (-), 1:1.5 (0) and 1:2 (+). Table 2 shows the experimental design matrix of the 3^2 full factorial, composed of 9 experiments performed in duplicate, plus a triplicate at the center point, with their respective values of percentage yield obtained for NFOH synthesis. Of all the design points the center point had a maximum average yield of 81.7%, this being the best result relative to those obtained in previous works, 56.0% [8], and 61.4%, the latter with addition of formaldehyde solution in two steps [20].

A quadratic model (Eq. 1 below), obtained by least-squares regression, was found to be the most adequate to

Table 2. 3^2 Factorial Design Levels and Results for the Synthesis of Hydroxymethylnitrofurazone

Exp.	Reaction Time	NF:K ₂ CO ₃ Proportion	Yield _I (%)	Yield _{II} (%)	Yield _{III} (%)	Yield _m (%)
1	-	-	40.07	43.12	-	41.60
2	-	0	70.53	72.04	-	71.29
3	-	+	52.81	50.54	-	51.68
4	0	-	54.15	57.28	-	55.72
5	0	0	76.14	85.53	83.55	81.74
6	0	+	52.17	50.25	-	51.21
7	+	-	73.99	60.99	-	67.49
8	+	0	54.54	39.97	-	47.26
9	+	+	41.04	47.87	-	44.46

Reaction time levels: 3h (-); 7h (0); 11h (+). NF:K₂CO₃ ratio levels: 1:1 (-); 1:1.5 (0); 1:2 (+). Yield_I and Yield_{II} represent the duplicate values of yield reaction. Yield_{III} is the triplicate value obtained for central point. Yield_m is the respective mean value.

Table 3. Analyses of Variance of Quadratic Model for NFOH Synthesis

Variation source	SS	v	MS	F(calculated)	F(critical)
Regression	2366.184	5	473.237	4.2328	3.03
Residuals	1453.414	13	111.801		
Lack- of- Fit	1175.338	3	391.779	14.0889	3.71
Pure Error	278.0764	10	27.8076		
Total SS	3819.592	18			

% of explained variance: 61.95; maximum % explainable variance: 92.72.

describe the dependence of the selected factors on the response (yield). In the equation, $\hat{y}$ corresponds to the predicted reaction yield value (%), and x_1 and x_2 are the coded values for the reaction time and NF:K₂CO₃ ratio, respectively. Both studied factors were found to be important to describe the yield, and they need to be analyzed together since Eq. 1 has a relatively large interaction term. In the Analysis of Variance of the quadratic model regression results (Table 3), about 62% of variance was explained ($r^2 = 0.62$) by the model. The value of the mean square lack of fit/mean square pure error ratio F -test was 14.09, indicating significant lack-of-fit ($F_{3,10} = 3.71$) at the 95% confidence level. These results indicate that the model residuals, i.e. differences between predicted and experimental values cannot be explained only by error variations of the experimental observations, and may be related to other factors not controlled in this study.

$$\hat{y} = 74.68 - 0.89 x_1 - 2.91 x_2 - 10.11 x_1^2 - 15.91 x_2^2 - 8.28 x_1 x_2 \quad (1)$$

$(\pm 2.46) \quad (\pm 1.52) \quad (\pm 1.52) \quad (\pm 2.52) \quad (\pm 2.52) \quad (\pm 1.86)$

Fig. (2) shows the contour plot for Eq. 1, pointing out the predicted yield in terms of coded variables x_1 (reaction time) and x_2 (NF:K₂CO₃ ratio). Despite the lack-of-fit, the obtained response surface shows the general trend of the experimental results. The elliptic paraboloid aspect of surface has maximum points at $x_1 = -0.01$ and $x_2 = -0.09$, corresponding to about 7.0h of reaction time and 1:1.3 for the NF:K₂CO₃ ratio, close to the center point, where the maximum average experimental yield was obtained. The surface is slightly flattened in x_2 axis direction (NF:K₂CO₃). This means that the yield is somewhat more sensitive to changes in K₂CO₃ content than to the reaction time for the ranges of factor levels studied here. Analysis of equation 1 also demonstrates the influences of the factor level changes. The x_2 quadratic term coefficient (-15.91 for K₂CO₃) presents the major influence compared with the quadratic coefficient for x_1 (-10.11 for reaction time). A canonical analysis of Eq. 1 confirmed this observation. The largest eigenvalue, -18.1, has an eigenvector in the direction of greatest negative curvature in Fig. (2) that is much more correlated with x_2 , the NF:K₂CO₃ ratio than the reaction time for intervals varied in our design. The lowest eigenvalue, -8.0, has an eigenvector more correlated with x_1 , the codified reaction time. As such it is important to maintain control of the NF:K₂CO₃ ratio to remain close to the maximum yield. Finally, the -8.28 interaction coefficient indicates an antagonistic effect between reaction time and NF:K₂CO₃, i.e. one factor should

be increased while the other is decreased in order to increase yield.

Fig. (2). Response surface contour plot of predicted yield (%) for coded variables x_1 (reaction time) and x_2 (proportion NF: K₂CO₃).

No matter which conditions have been used, it is important to point out that formaldehyde must be added in two steps for displacing the equilibrium towards NFOH formation. It is also worth noting that reaction time is very important for avoiding the reversion of NFOH into NF. Besides these factors, the reaction pH has to be controlled in order to avoid that reversion. It is well known that hydroxymethyl derivatives can be converted into their non-hydroxylated prototypes at high pH,

The 3² factorial design used here allowed us to improve the conditions of NFOH synthesis -the reaction time and NF:K₂CO₃ ratio --, thus increasing the yield around 20% -- from 42% to 82%. The conditions found have illustrated the influence of these factors in the NFOH synthesis, as already mentioned.

The analysis of response surface from 3² factorial design are found to be efficient tools for the optimization of hydroxymethylnitrofurazone (NFOH) synthesis. A quadratic

response surface for NFOH synthesis, although the lack-of-fit observed, represents the principal characteristics of the factors studied. Maximum yield occurs at the center point of the factorial design using a 7h reaction time and a 1:1.5 (NF:K₂CO₃) optimal ratio.

CONCLUSIONS

The 3² factorial design and response surface analysis are found to be efficient tools for the optimization of hydroxymethylnitrofurazone (NFOH) synthesis. A quadratic response surface for NFOH synthesis, even though it suffers from the lack-of-fit, represents the principal characteristics of the factors studied. Maximum yield occurs close to the center point of the factorial design with a 7h reaction time and a 1:1.3 (NF:K₂CO₃) optimal ratio.

EXPERIMENTAL SECTION

Material and Methods

Nitrofurazone (NF) (5-nitro-furfurylidenesemicarbazone) was purchased from Avocado (Heysam, UK), potassium carbonate was from Ecibra (Sao Paulo, Brazil). All other reagents were of analytical grade from Merck (Darmstadt, Germany). Melting points were determined in a Büchi capilar apparatus. Infrared spectra were obtained with a FTIR Bomem spectrophotometer. ¹H and ¹³C NMR spectrometries were carried out in a NMR Bruker Spectrometer, Advanced DPX-300, 300 MHz, using DMSO-d₆.

Factorial Design

Reaction time and NF:K₂CO₃ ratio (Table 3) were applied in 3² factorial design. Data execution was carried out using the Statistica computer program [21].

Synthesis of NFOH

The quantity in mmol and grams for all reaction partners should be added. The synthesis of NFOH performed using nitrofurazone (NF) (0.99 g, 5 mmol) was mixed with potassium carbonate (K₂CO₃) (ratios in Table 3) and suspended in water (10 mL). Formaldehyde solution (37% v/v, 18 mL) was added in two steps, part at the beginning of the reaction and the other part a half-time later. The reaction was stirred at room temperature for 3, 7 and 11h, according to the experiments in the factorial design, and then filtered. The filtrate was evaporated under low pressure. The product, NFOH, was crystallized from methanol–water (6:0.1) and yellow crystals were obtained.

Compound Identification

Melting point (150-154 °C); ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm): 11.02 (s, 1H, H8), 7.81 (d, J = 3.9 Hz, 1H, H4 – superimposed signals), 7.80 (s, 1H, H6) 7.64 (t, J = 6.3 Hz, 1H, H12), 7.25 (d, J = 3.9 Hz, 1H, H3), 5.57 (t, J = 6.9 Hz, 1H, H14), 4.61 (t, J = 6.6 Hz, 2H, H13); ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆, δ, ppm): 154.47 (C9), 152.42 (C5), 151.25 (C2), 127.82 (C6), 115.11 (C4), 112.63 (C3), 63.07

(C13); IR (KBr, ν, cm⁻¹): 3410 (ν_{OH}), 3334 and 3162 (ν_{NH}), 2980 and 2860 (ν_{CH}), 1674 (ν_{CO}), 1522 and 1359 (ν_{NO2}); Mass spectrometry: m/z: 228 [M⁺], 210, 198, 155.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to FAPESP (grant 01/01192-3 and fellowship (04/06097-7) to G.H.G.T) for financial support and to CNPq.

REFERENCES

- [1] WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) Strategic Direction for Research. Chagas Disease, Geneva, **2002**.
- [2] Dias, J.C.P. *Doença de Chagas: clínica e terapêutica SUCAM*, **1990**.
- [3] de Andrade, A.L.S.S.; Zicker, F.; de Oliveira, R.M.; Silva, S.A. E.; Luquetti, A.; Travassos, L.R.; Almeida, I.C.; de Andrade, S.S.; de Andrade, J.G.; Martelli, C.M.T. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. **1996**, *348*, 1407.
- [4] Korolkovas, A. *Dicionário terapêutico Guanabara; Guanabara Koogan*: Rio de Janeiro, **2003**.
- [5] Andrade, Z.A.; Brenner, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. **1969**, *11*, 222.
- [6] Henderson, G.B.; Ulrich, P.; Fairlamb, A.H.; Rosenberg, I.; Pereira, M.; Sela, M.; Cerami. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione dissulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1988**, *85*, 5374.
- [7] Gonçalves, M.F.; Chung, M.C.; Colli, W.; Miranda, M.T.M.; Ferreira, E.I. Efeito da associação da nitrofurazona e primaquina em células LLC-MK2 infectadas com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **1994**, *27*, 164.
- [8] Chung, M.C.; Guido, R.V.C.; Martinelli, T.F.; Goncalves, M.F.; Polli, M.C.; Botelho, K.C.A.; Varanda, E.A.; Colli, W.; Miranda, M.T.M.; Ferreira, E.I. Synthesis and *in vitro* antichagasic activity of hydroxymethylnitrofurazone, a prodrug of nitrofurazone. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 4779.
- [9] Du, X.H.; Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P.S.; Caffrey, C.R.; Holler, T.P.; McKerrow, J.H.; Cohen, F.E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2695.
- [10] Aguirre, G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Fernandez, M.; Gonzalez, M.; Denicola, A.; Otero, L.; Gambino, D.; Rigol, C.; Olea-Azar, C.; Faundez, M. *In vitro* activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4885.
- [11] Trossini, G.H.G.; Malvezzi, A.; T-do Amara, I. A.; Rangel-Yagui, C.O.; Izidoro, M.A.; Cezari, M.H.; Juliano, L.; Chin, C.M.; Menezes, C.M.S.; Ferreira, E.I. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2010**, *25*, 62.
- [12] Friis, G.J.; Bundgaard, H. Design and application of prodrugs. In: Krogsgaard-Larsen, P.; Liljefors, T.; Madsen, U., Eds. *A Textbook of Drug Design and Development*; Harwood Academic: Amsterdam, **1996**.
- [13] Pilipauskas, D.R. Can the time from synthesis design to validated chemistry be shortened? *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 463.
- [14] Neto, B.B.; Scarminio, E.S.; Bruns, R.E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Quim. Nova* **2006**, *29*, 1401.
- [15] Ferreira, S.L.C.; Bruns, R.E.; Silva, E.G.P.; Santos, W.N.L.; Quintella, C.M.; David, J.M.; Andrade, J.B.; Breikreitz, M.C.; Jardim, I.C.S.F.; Neto, B.B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J. Chromatography*. **2007**, *1158*, 2.
- [16] Bruns, R.E.; Scarminio, I.S.; de Barros Neto, B.; *Statistical Design – Chemometrics*, Amsterdam: Elsevier, **2006**.

- [17] Santos, K.S.C.R.; Silva, H.S.R.; Ferreira, E.I.; Bruns, R.E. ³*
Factorial design and response surface analysis optimization of N-carboxybutylchitosan synthesis *Carbohydr. Polym.* **2005**, 59, 37.
- [18] Siró, J.; Ramos, A.; Vaquero, J.J.; Alvarez-Builla, J.; García-Navío, J.L. Optimized synthesis of Di, Tri and tetra fused pyridazinium cations. *Tetrahedron*, **2000**, 56, 2469.
- [19] Fernandes, J.P.D. Felli, V.M.A. Evaluation of the influence of base and alkyl bromide on synthesis of pyrazinoic acid esters through factorial design. *Quim. Nova*, **2009**, 32, 2464-2466.
- [20] Doriguetto, A.C.; Silva, C.H.T.D.; Ellena, J.; Trossini, G.H.G.; Chung, C.M.; Ferreira, E.I. 5-nitro-2-furaldehyde N-(hydroxymethyl)-semicarbazone *Acta Crystallogr.*, E-61. **2005**, 61, 2099.
- [21] Statsoft Inc. , Statistica for windows, Version 6.0, 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104, USA, **1998**.

Molecular modeling study on the disassembly of dendrimers designed as potential antichagasic and antileishmanial prodrugs

Jeanine Giarolla · Kerly F. M. Pasqualoto ·
Daniela G. Rando · Márcio H. Zaim ·
Elizabeth I. Ferreira

Received: 8 June 2011 / Accepted: 13 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract A molecular modeling study was carried out to investigate the most likely enzymatic disassembly mechanism of dendrimers that were designed as potential antichagasic and antileishmanial prodrugs. The models contained *myo*-inositol (core), L-malic acid (spacer), and active agents such as 3-hydroxyflavone, quercetin, and hydroxymethylnitrofurazone (NFOH). A theoretical approach that considered one, two, or three branches has already been performed and reported by our research group; the work described herein focused on four (models A and B), five, or six branches, and considered their physico-chemical properties, such as spatial hindrance, electrostatic potential mapping, and the lowest unoccupied molecular orbital energy (E_{LUMO}). The findings suggest that the carbonyl group next to the *myo*-inositol is the most promising ester breaking point.

Keywords Molecular modeling · Chagas disease · Leishmaniasis · Dendrimer disassembly · Dendrimeric prodrugs

Introduction

The causative agent of the neglected tropical disease known as Chagas disease is the parasite *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted to mammals by a bite from an insect vector [1]. This insect belongs to the family *Reduviidae* and subfamily *Triatominae*. The protozoan and the disease were described and discovered 101 years ago by the Brazilian scientist Carlos Chagas [2]. The infection occurs across the Americas, but especially in the region between the southern United States and southern Argentina and Chile. Almost 15 million people are currently infected and 90 million people are at risk of acquiring the disease [3]. Two drugs are available to treat Chagas disease, benznidazole and nifurtimox. However, the efficacies of both of these drugs are unclear in the chronic phase of the disease, they show high incidences of side effects, and they both also require long treatment times [4].

Almost 20 species of the protozoan genus *Leishmania* sp. can cause leishmaniasis, which is another neglected tropical disease, and is transmitted by the bite of a phlebotomine sandfly [5]. Clinical manifestations include cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis (“kala-azar;” fatal if not treated). Twelve million people are currently infected with this disease, and 60,000 die every year [6]. The disease is considered endemic to 88 countries, including countries in southern Europe, North Africa, the Middle East, Central and South America, and the Indian subcontinent. It is not, however, endemic to Southeast Asia and Australia [5, 7]. Unfortunately, the drugs that are available to treat it are toxic, expensive, and some of them require parenteral administration. These disadvantages can lead patients to abandon leishmaniasis treatment, resulting in the emergence of drug-resistant

J. Giarolla (✉) · K. F. M. Pasqualoto · M. H. Zaim · E. I. Ferreira
LAPEN, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical
Sciences, University of São Paulo (USP),
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária,
São Paulo, SP, Brazil 05508-900
e-mail: jeaninegiarolla@yahoo.com.br

D. G. Rando
Department of Exact and Earth Sciences,
Federal University of São Paulo (UNIFESP),
Diadema, SP, Brazil

strains [5, 8–10]. Consequently, new chemotherapeutic agents against Chagas disease and leishmaniasis are urgently required.

Hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), a nitrofurazone derivative synthesized in our laboratory, has proven to be a promising antichagasic compound; it presented enhanced in vitro activity [11] in trypomastigotes, especially amastigotes, in vivo activity in a murine model [12], and is four times less toxic than its prototype, benznidazole [13]. This derivative has stimulated several studies in our research group and in our co-workers' group. Flavonoids such as quercetin and 3-hydroxyflavone have also shown good in vitro activity against Chagas disease and leishmaniasis. However, in vivo, they were not active against leishmaniasis, or they presented a lower activity than miltefosine, which is the standard drug used in biological assays [14]. Therefore, it is necessary to design efficient transporters of these compounds in order to promote their use in therapeutic applications [15].

Prodrug design is a molecular modification process that is useful for improving drug characteristics; mainly their pharmaceutical, pharmacokinetic, and pharmacodynamic properties [16]. In this context, Chung and co-workers published a quite interesting review article in 2008 on twenty years of research in the field of the design of prodrugs for treating neglected and extremely neglected diseases [17].

A dendrimer is a unique class of synthetic molecules that provide significant control over the size, branching density, and surface functionality of molecules. These features imply that dendrimers are promising candidates for drug carriers [18]. Additionally, it has been observed that there is a better control over the release of a drug when it is covalently linked to a dendrimeric system, instead of forming a complex through encapsulation or electrostatic interactions [19, 20]. Dendrimer prodrug development may involve the following strategies: (1) the drug is linked directly to the dendrimer surface, establishing a covalent interaction for example [18, 21, 22]; (2) a linker molecule that is responsible for the interaction between branches is included; [18, 23] (3) each branch contains a drug molecule, leading to an exponential increase in the active agent with each subsequent generation [the patent on this approach was claimed by Giarolla and Ferreira in 2007 [24]]; (4) drug molecules are bound to the dendritic structure through electrostatic, hydrophobic, and hydrogen-bonding interactions [21, 22]. There have already been studies that have explored the potential of dendrimers as prodrugs [25, 26].

The aim of this study was to apply molecular modeling methods as promising tools in a disassembly investigation of first-generation dendrimer prodrugs. The model prodrugs studied had four (models A and B), five, or six branches.

They were composed of *myo*-inositol (the dendrimer core), L-malic acid (the spacer), and three potentially antichagasic and antileishmanial bioactive agents: 3-hydroxyflavone, quercetin, and NFOH (see Fig. 1). Ester cleavage is probably performed enzymatically by nonspecific esterases. For this reason, the two carbonyl groups from L-malic acid were exploited. Similar preliminary studies have already been performed by our group for models containing one, two, or three branches [27].

Computational details

The computational procedure employed in this work was almost the same as that reported previously [27], but the dendrimers studied here had four (models A and B), five, or six branches. The three-dimensional (3D) structures of each dendrimer containing four, five, or six branches as well as the bioactive agents NFOH, 3-hydroxyflavone, and quercetin were constructed in their neutral forms using the HyperChem 7.51 software [28]. The crystallized structures retrieved from the Brookhaven Protein Data Bank (PDB) [29] and employed as standard geometries to build the 3-hydroxyflavone and quercetin models were 2g0l (NMR solution method) [30] and 1e8w (resolution 2.50 Å) [31], respectively. The NFOH 3D structure was constructed based on the crystallized structure of nitrofurazone (PDB entry code 1yki; resolution 1.70 Å) [32].

The energy of each model was minimized through the use of the MM+(molecular mechanics) force field (HyperChem 7.51 [28] and the MOLSIM 3.2 software package [33]), without any constraints. The MM+force field corresponds to the extended MM2 force field [34]. Partial atomic charges were calculated using the AM1 semiempirical method [35], also implemented in the HyperChem 7.51 program. The energy-minimization methods—steepest descent and conjugate gradient—were performed based on a set number of cycles or iterations for each procedure. The procedures were run sequentially, considering an energy convergence criterion. The energy-minimized models were used as initial structures to perform molecular dynamics (MD) simulations [2 ns; size step 0.001 ps at 300 K]. Trajectory files were recorded every 20 steps, resulting in 100,000 conformations for each model. A dielectric constant value of 3.5, which simulates the environment of the biological membranes, was used in the analysis of each model [36]. The hydration shell model proposed by Hopfinger [37] was employed to estimate the solvation energy contribution of the lowest energy conformation identified from the MD simulation, since the MOLSIM 3.2 software does not consider explicit water molecules during the MD simulations. Additionally, the hydrogen-bonding

Fig. 1 Schematic representation of the dendrimer prodrugs studied in this work, which contained *myo*-inositol (core), L-malic acid (spacer), and the active agents (3-hydroxyflavone, quercetin, and NFOH). The

skeletons of the systems containing four (models A and B), five, or six branches are also presented

energy contribution was computed for only the minimum energy conformers from MD simulations. The absence of explicit water molecules from the simulation analysis can lead to the generation and sampling of artifact states rather than the actual binding mode. On the other hand, the inclusion of explicit waters raises issues such as the assignment of water molecules and the degree of sampling needed to generate equilibrium/steady ensembles. These unknowns can also lead to artifact states. The use of an implicit solvation model as a hydration shell scheme appeared to be both a good compromise and a way to evaluate solvation effects [37].

The lowest energy conformation of each model was selected from MD simulation, its energy was minimized, and the electrostatic potential charges (ChelpG) were calculated using the ab initio method HF/3-21G* (Gaussian G03) [38]. The electrostatic potential (EP) of each model was mapped on a Connolly surface using a color ramp ranging from -8.5 to 8.5 e^{-2} . Negative values of EP (i.e., higher electronic densities) are depicted in red, while positive values (i.e., lower electronic densities) are shown in blue. The lowest unoccupied molecular orbital energy (E_{LUMO}) of each model was also computed and visualized using a range of -0.935 to 0.935 e^{-2} . Hydrogen bonds were displayed using the ViewerLite 4.2 program [39]. In this software, the bonds are shown between bond donors and acceptors throughout the entire molecule, and they are shown whether or not there are explicit hydrogen atoms. This can indicate intramolecular interactions that maintain the stability of the structure (branches), and can highlight intermolecular interactions with the aqueous medium solvent.

Results and discussion

As already mentioned, the two carbonyl groups from L-malic acid that were previously investigated [27] were also exploited in this study. These groups are assumed to be involved in dendrimer disassembly. The first carbonyl group is closer to the *myo*-inositol core, whereas the second is near the bioactive agent (3-hydroxyflavone, quercetin, or NFOH). The spatial hindrance, electronic density [map of electrostatic potential (MEP)], and LUMO distribution map were carefully evaluated. Those physicochemical properties may provide information indicating which of the moieties—the core or the bioactive agent—in the dendrimer system will be released first upon enzymatic action. A group presenting low spatial hindrance would be more likely to undergo enzymatic attack. The low electronic density and LUMO distribution on the carbonyl groups suggest that they are the most likely region to suffer an enzymatic nucleophilic attack.

The molecular electrostatic potential at a given point $p(x, y, z)$ in the vicinity of a molecule is the force acting on a positive test charge (a proton) located at p through the electrical charge cloud generated through the molecule's electrons and nuclei. Although the molecular charge distribution remains unperturbed by the presence of the external test charge (no polarization occurs), the electrostatic potential of the molecule is still a good guide to the molecule's reactivity towards positively or negatively charged reactants. This is typically visualized by mapping the electrostatic potential onto a surface that reflects the molecule's boundaries. This surface can be generated by overlapping the van der Waals radii of the molecule,

through the use of algorithms that calculate the solvent-accessible surface of the molecule, or by employing a constant value for the electron density. The MEP can also be used to identify sites in the molecular system that act as proton donors or acceptors, or as nucleophiles or electrophiles, in terms of the drug–receptor molecular recognition process.

Table 1 presents the values of the total potential energy (E_{total}) obtained for the lowest energy models selected from MD simulations, the hydrogen-bonding energy contributions (E_{Hb}), the number of hydrogen bonds (Hb) in the selected models, and the E_{LUMO} values found for the models containing four (models A and B), five, or six branches plus the bioactive agent (3-hydroxyflavone, quercetin, or NFOH).

The E_{total} value corresponds to the sum of all energy contributions within each chosen model, such as those relating to stretching, bending, torsion, type 1–4 interactions (Lennard–Jones), van der Waals interactions, electrostatic interactions, hydrogen bonding, and solvation [36]. In general, the more negative the value of E_{total} , the more energetically favorable the system. However, more flexible molecular systems (i.e., those with more degrees of freedom) tend to present higher E_{total} values.

All dendrimer models containing NFOH as the bioactive agent were more energetically favorable (Table 1) than those with quercetin, except in the case of the model with four branches (model A). The six-branch dendrimers gave the most stable models for both quercetin and NFOH ($E_{\text{total}} = -400.03$ and -482.24 kcal mol⁻¹, respectively). These models also presented the most negative values for the E_{Hb} contribution (-571.63 and -512.31 kcal mol⁻¹, respectively). The number of intramolecular hydrogen bonds was 13 for

both. The model with NFOH and four branches (model B) had a lower E_{total} value (-341.44 kcal mol⁻¹) and a higher E_{Hb} contribution (-361.79 kcal mol⁻¹) than the corresponding quercetin-based model. Additionally, it presented 11 intramolecular hydrogen bonds (see Table 1).

Otherwise, the set of models with 3-hydroxyflavone as the bioactive agent presented the highest E_{total} values (positive values), so this set was disregarded for further consideration.

The LUMO is a good indicator of electron-accepting ability. Therefore, E_{LUMO} indicates the ability of a molecule to accept electrons or act as an electrophile. The lower the E_{LUMO} value, the greater the ability of the system to act as an electron acceptor [40]. It is interesting to evaluate this property, for instance, when a nucleophilic enzymatic attack is needed to promote dendrimer disassembly. If we consider Table 1, all of the dendrimer models containing NFOH as the bioactive agent presented lower E_{LUMO} values than the respective models with 3-hydroxyflavone and quercetin.

The dendrimer models with four branches (model A) containing quercetin and NFOH as bioactive agents are presented in Fig. 2. The quercetin-based model showed the establishment of five intramolecular hydrogen bonds (bond lengths: 1.74, 2.16, 2.65, 2.85, and 2.86 Å). Moreover, in the CPK (Corey–Pauling–Koltun) or space-filling model, only minor spatial hindrance was noted at the carbonyl group near the core (*myo*-inositol). This feature renders this moiety more favorable to enzymatic attack. The same carbonyl group presented a region of low electronic density (green color), which can be visualized in the MEP. Therefore, the low density of electrons in this area could favor a nucleophilic enzymatic attack, which is needed for dendrimer disassembly. The LUMO distribution was

Table 1 E_{total} , E_{Hb} , and E_{LUMO} values, as well as the number of Hb found for the models containing dendrimers with four (models A and B), five, or six branches as well as the bioactive agent (3-hydroxyflavone, quercetin, or NFOH)

Dendrimer	E_{total} (kcal/mol)	E_{Hb} (kcal/mol)	Number of Hb	E_{LUMO} (kcal/mol)
Four branches (model A)				
3-Hydroxyflavone	82.10	-145.38	4	0.64
Quercetin	-257.65	-380.48	5	0.30
NFOH	-215.59	-245.53	11	-0.87
Four branches (model B)				
3-Hydroxyflavone	87.63	-118.14	2	0.97
Quercetin	-242.29	-365.17	8	0.74
NFOH	-341.44	-361.79	11	-0.90
Five branches				
3-Hydroxyflavone	116.10	-147.25	7	0.82
Quercetin	-390.95	-510.48	7	0.27
NFOH	-420.27	-450.54	13	-0.80
Six branches				
3-Hydroxyflavone	151.62	-138.31	5	0.49
Quercetin	-400.03	-571.63	13	0.36
NFOH	-482.24	-512.31	13	-0.83

Fig. 2 The lowest energy conformations of the dendrimer with four branches (model A) containing (1) quercetin or (2) NFOH, as obtained from MD simulation. The intramolecular Hb (green lines) and the CPK or space-filling models are also presented (ViewerLite 4.2). The carbonyl group that shows the lowest spatial hindrance in the tube model and the CPK model is represented in *green* and also

highlighted. MEPs are represented using a color ramp from -8.5 (intense red) to 8.5 (intense blue) e^{-2} , and the LUMO distribution uses a color ramp from -0.935 (intense red) to 0.935 (intense blue) e^{-2} (GaussView 3.0). The carbon atoms are shown in gray, oxygen in red, nitrogen in blue, and hydrogen atoms are depicted in white

investigated in the carbonyl group near quercetin. Although there is a favorable LUMO distribution in this region, it presents greater spatial hindrance than the carbon from the carbonyl group near the core. Thus, if we focus mainly on the effects of spatial hindrance and electronic distribution, it is clear that the *myo*-inositol will probably be released from the dendrimer system before the bioactive agent.

The NFOH model presented eleven intramolecular hydrogen bonds (1.82, 1.97, 2.20, 2.40, 2.44, 2.81, 2.89,

2.95, 2.99, 3.09, 3.19 Å) that appear to contribute to the conformational arrangement adopted by this system (see Fig. 2). The CPK or space-filling model indicated that the carbonyl group closest to the *myo*-inositol was the most likely to undergo enzymatic attack due to its low spatial hindrance. This finding corroborated the MEP analysis. The same carbonyl group presented a neutral/positive electronic density region (green/blue color), which would be an attractive area for nucleophilic enzymatic action and thus

dendrimer disassembly. The LUMO distribution did not map to this carbonyl group.

Figure 3 presents the dendrimer models with four branches (model B) containing quercetin or NFOH. It is quite probable that for the model containing quercetin,

dendrimer disassembly will occur in the carbonyl group near the core. The findings from the CPK and tube models and MEP indicate this. Regarding the CPK model, the carbonyl group near *myo*-inositol showed the lowest spatial hindrance, which is an important feature of any enzymatic

Fig. 3 The lowest energy conformations of the dendrimer with four branches (model B) containing (1) quercetin or (2) NFOH, as obtained from MD simulation. The intramolecular Hb (green lines) and the CPK or space-filling models are also presented (ViewerLite 4.2). The carbonyl group that shows the lowest spatial hindrance in the tube model and the CPK model is represented in green and also

highlighted. MEPs are represented using a color ramp from -8.5 (intense red) to 8.5 (intense blue) e^{-2} , and the LUMO distribution uses a color ramp from -0.935 (intense red) to 0.935 (intense blue) e^{-2} (GaussView 3.0). The carbon atoms are shown in gray, oxygen in red, nitrogen in blue, and hydrogen atoms are depicted in white

attack needed for dendrimer disassembly. Moreover, in the tube model, the formation of eight intramolecular hydrogen

bonds (2.09, 2.19, 2.20, 2.47, 2.64, 2.87, 2.95, 3.00 Å) that are relevant to the model's stability and conformational

Fig. 4 The lowest energy conformations of the dendrimer with five branches containing (1) quercetin or (2) NFOH, as obtained from MD simulation. The intramolecular Hb (green lines) and the CPK models are also presented (ViewerLite 4.2). The carbonyl group that shows the lowest spatial hindrance in the tube model and the CPK or space-filling model is represented in green and also highlighted. MEPs are

represented using a color ramp from -8.5 (intense red) to 8.5 (intense blue) e^{-2} , and the LUMO distribution uses a color ramp from -0.935 (intense red) to 0.935 (intense blue) e^{-2} (GaussView 3.0). The carbon atoms are shown in gray, oxygen in red, nitrogen in blue, and hydrogen atoms are depicted in white

arrangement was observed. The green color for the MEP on the this carbonyl carbon indicates a neutral area, which means that it is a region that could suffer an enzymatic nucleophilic attack. Although the LUMO was visualized in the other carbonyl group, all the other findings discussed

here suggest that the ester break point will probably occur in a carbonyl near the core.

The corresponding dendrimer model designed with NFOH showed that the carbonyl group near the bioactive agent is the most likely of these groups to suffer an

Fig. 5 The lowest energy conformations of the dendrimer with six branches containing (1) quercetin or (2) NFOH, as obtained from MD simulation. The intramolecular Hb (green lines) and the CPK models are also presented (ViewerLite 4.2). The carbonyl group that shows the lowest spatial hindrance in the tube model and the CPK or space-filling model is represented in green and also highlighted. MEPs are

represented using a color ramp from -8.5 (intense red) to 8.5 (intense blue) e^{-2} , and the LUMO distribution uses a color ramp from -0.935 (intense red) to 0.935 (intense blue) e^{-2} (GaussView 3.0). The carbon atoms are shown in gray, oxygen in red, nitrogen in blue, and hydrogen atoms are depicted in white

Table 2 Most elucidative physicochemical properties in relation to the region most likely to undergo an enzymatic nucleophilic attack, as evaluated for the dendrimers containing quercetin or NFOH with four (models A and B), five, or six branches

Dendrimer	Spatial hindrance (solvent-accessible molecular surface)	Electrostatic potential (MEP)	Carbonyl C more susceptible to the enzymatic attack
<i>Four branches (model A)</i>			
Quercetin			near the core
NFOH			near the core
<i>Four branches (model B)</i>			
Quercetin			near the core

enzymatic attack, considering the findings from the CPK and tube models as well as the MEP distribution. The lower spatial hindrance in the region of this carbonyl carbon can be visualized in the CPK model. Eleven intramolecular hydrogen bonds can be observed in the tube model (1.82, 2.10, 2.11, 2.14, 2.60, 2.66, 3.00, 3.05, 3.02, 3.08, 3.17 Å). Moreover, a green/blue (neutral/positive) color in this area of the MPE distribution indicates that enzymatic hydrolysis will probably occur in this region. However, controversially, the LUMO distribution did not occur in any of the L-malic acid carbonyl groups.

The five-branch dendrimer models containing quercetin or NFOH are presented in Fig. 4. In the model containing quercetin, the carbonyl near the bioactive agent appears to be a more likely group to suffer enzymatic action. The tube and CPK models as well as the MPE distribution explain this assumption. Seven intramolecular hydrogen bonds can be visualized in the tube model (1.98, 2.27, 2.41, 2.63, 2.98, 2.99, 3.09 Å). As discussed before, these intramolecular interactions contribute to the conformational arrangement of the system. Moreover, the carbon near quercetin presented the lowest steric hindrance, as seen in the CPK

Table 2 (continued)

Dendrimer	Spatial hindrance (solvent-accessible molecular surface)	Electrostatic potential (MEP)	Carbonyl C more susceptible to the enzymatic attack
<i>Four branches (model B)</i>			
NFOH			near bioactive agent
<i>Five branches</i>			
Quercetin			near bioactive agent
NFOH			near the core

model. The same carbonyl group represented a neutral region (green color) in the MEP distribution, indicating that nucleophilic attack can occur in this portion of the system. The LUMO distribution was seen in another carbonyl group.

The dendrimer model containing NFOH indicated that the carbonyl carbon near *myo*-inositol is the most likely to suffer an enzymatic attack. The spatial disposition of this carbonyl group can be analyzed mainly using the tube and CPK models (see Fig. 4). Thirteen intramolecular hydrogen bonds were noted (1.99, 2.31, 2.67, 2.75, 2.77, 2.87, 2.90, 2.97, 3.03, 3.08, 3.15, 3.19, 3.20 Å). In addition, the same

group represented a neutral region (green color) in the MEP distribution, indicating that it could suffer the nucleophilic attack needed for dendrimer disassembly. The LUMO distribution did not contribute to these findings, as it did not occur in the carbonyl group of interest.

In the dendrimer model with six branches containing quercetin, the carbonyl group near *myo*-inositol seemed to be the most likely to suffer an enzymatic approach and, consequently, a nucleophilic attack. Accordingly, in this particular model, dendrimer disassembly will probably start in the core, with the bioactive agents released afterwards. The CPK models as well as the MPE distributions can be

Table 2 (continued)

Dendrimer	Spatial hindrance (solvent-accessible molecular surface)	Electrostatic potential (MEP)	Carbonyl C more susceptible to the enzymatic attack
<i>Six branches</i>			
Quercetin			near the core

NFOH			near bioactive agent

* Solvent-accessible surface area: carbonyl carbons near the core are in green; carbonyl carbons near the bioactive agent are in yellow (ViewerLite 4.2); MEPs: regions colored in green/blue indicate neutral/positive electronic density distribution (GaussView 3.0)

visualized in Fig. 5, and they confirm these assumptions. The models show that the lowest spatial hindrance is presented by the carbonyl carbon near *myo*-inositol; this is a fundamental feature of any enzymatic approach. There are also thirteen intramolecular hydrogen-bond interactions (2.12, 2.20, 2.31, 2.56, 2.65, 2.68, 2.72, 2.93, 3.05, 3.09, 3.12, 3.14, 3.16 Å). Moreover, in the MPE, the corresponding carbonyl group showed a green area, meaning that it is a neutral region, making it likely to suffer from enzymatic action. The LUMO distribution found for the dendrimer model with quercetin was in another carbonyl group, near the active agent. The corresponding model with NFOH presented thirteen intramolecular hydrogen bonds (1.89, 2.01, 2.79, 2.79, 2.83, 2.85, 2.86, 2.88, 2.87, 3.05, 3.06, 3.12, 3.15 Å). In the tube and CPK models, the lowest spatial hindrance was seen in the carbonyl group next to the active agent. Moreover, these carbonyl groups were a green/blue color (neutral/positive electron density) in the MEP distribution, indicating that they are the most likely to suffer a nucleophilic attack (see Fig. 5). The LUMO distribution of the NFOH-based

dendrimer model was not seen in any of the groups investigated in this study.

The most important findings of this study for the investigated dendrimer systems containing quercetin or NFOH are summarized in Table 2. This table considers the most elucidative physicochemical properties in relation to defining the region most likely to suffer an enzymatic nucleophilic attack (carbonyl carbons near the core or near the bioactive agent). The spatial hindrance can be visualized through the solvent-accessible surface area (carbonyl carbons near the core are shown in green; carbonyl carbons near the bioactive agent are shown in yellow), whereas the electrostatic potential can be seen through the MEPs (regions colored in green/blue indicate neutral/positive electronic density distributions).

Conclusions

The molecular modeling study presented herein can be considered an important assessment, as it demonstrates the

pre-disassembly behavior of dendrimers designed as potential antichagasic and antileishmanial prodrugs.

The molecular models were primarily analyzed in terms of physicochemical properties such as the spatial hindrance, the electrostatic potential map, and the lowest unoccupied molecular orbital energy. Based on the theoretical findings, the region most likely to suffer an enzymatic nucleophilic attack was determined. The carbonyl group next to the *myo*-inositol seems to be the most promising candidate for the point at which the ester breaks during dendrimer disassembly in the systems that contain quercetin as the bioactive agent, except for the five-branch dendrimer system. The dendrimers containing NFOH, on the other hand, show different release behavior for each size category.

The synthesis of these molecular models and release studies of them are currently being carried out, in order to hopefully validate the theoretical results obtained so far.

Acknowledgments The authors are grateful to the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (01/01192-3, 06/00116-5, 07/59416-0, 08/54211-4, and 07/5461-0) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their financial support, and to the Chem21 Group, Inc., for the MOLSIM 3.2 academic license.

References

- Coura JR, Dias JCP (2009) Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:31–40
- Coura JR, Viñas PA (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465:S6–S7
- Clayton J (2010) Chagas disease 101. *Nature* 465:S4–S5
- Clayton J (2010) Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature* 465:S12–S15
- Lindoso JAL, Lindoso AABP (2009) Neglected tropical disease in Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 51:247–253
- Neuber H (2008) Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges* 6:754–765
- Herwaldt BL (1991) Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191–1199
- Yardley V, Khan AA, Martin MB, Slifer TR, Araujo FG, Moreno SNJ, Docampo R, Croft SL, Oldfield E (2002) In vivo activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:929–931
- Singh S, Sivakumar RJ (2004) Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Infect Chemother* 10:307–315
- Santos DO, Coutinho CER, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC (2008) Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 103:1–10
- Chung MC, Güido RVC, Martinelli TF, Gonçalves MF, Polli MC, Botelho KCA, Varanda EA, Colli W, Miranda MTM, Ferreira EI (2003) Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone produg. *Bioorg Med Chem* 11:4779–4783
- Davies C, Cardoso RM, Negrette OS, Mora MC, Chung MC, Basombrío MA (2010) Hydroxymethylnitrofurazone is active in a murine model of Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3584–3589
- Güido RVC, Ferreira EI, Nassute JC, Varanda EA, Chung MC (2001) Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao NF (nitrofurazona). *Rev Cienc Farm* 22:319–333
- Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Ruedi P (2006) Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure–activity relationship, and quantitative structure–activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1352–1364
- Kayser O, Kiderlen EAF, Croft ESL (2003) Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res* 90:55–62
- Chung MC, Silva ATA, Castro LF, Guido RVC, Nassute JC, Ferreira EI (2005) Latenciação e formas avançadas no transporte de fármacos. *Rev Bras Cienc Farm* 41:155–179
- Chung MC, Ferreira EI, Santos JL, Giarolla J, Rando DG, Almeida AE, Bosquesi PL, Menegon RN, Blau L (2008) Prodrugs for the treatment of neglected diseases. *Molecules* 13:616–677
- Svenson S (2009) Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm* 71:445–462
- Aulenta F, Hayes W, Rannard S (2003) Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *Eur Polym J* 39:1741–1771
- Uhrich K, Cannizzaro S, Langer R, Shakesheff K (1999) Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev* 99:3181–3198
- Liu M, Fréchet MJM (1999) Designing dendrimers for drug delivery. *Pharm Sci Technol Today* 2:393–401
- D'Emanuele A, Attwood D (2005) Dendrimer–drug interactions. *Adv Drug Deliv Rev* 57:2147–2162
- Najlah M, Freeman S, Attwood D, D'Emanuele A (2007) In vitro evaluation of endrimer prodrugs for oral drug delivery. *Int J Pharm* 336:183–190
- Giarolla J, Ferreira EI (2007) Patent 018070068714 (under analysis)
- Lee CC, Gillies ER, Fox ME, Guillaudeau SJ, Fréchet MJM, Dy EE, Szoka FC (2006) A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16649–16654
- D'Emanuele A, Jevprasesphant R, Penny J, Attwood D (2004) The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. *J Control Rel* 95:447–453
- Giarolla J, Rando DG, Pasqualoto KFM, Zaim MH, Ferreira EI (2010) Molecular modeling as a promising tool to study dendrimer prodrugs delivery. *J Mol Struct THEOCHEM* 939:133–138
- Hypercube Inc. (2002) HYPERCHEM, v.7.0 for Windows. Hypercube Inc., Gainesville
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE (2011) The Protein Data Bank. <http://www.pdb.org>
- Caddick S, Muskett FW, Stoneman RG, Woolfson DN (2006) Synthetic ligands for apo-neocarzinostatin. *J Am Chem Soc* 128:4204–4205
- Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wvmann MP, Williams RL (2000) Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular Cell* 6:909–919
- Race PR, Lovering AL, Green RM, Ossor A, White SA, Searle PF, Wrighton CJ, Hyde EI (2005) Structural and mechanistic studies of *Escherichia coli* nitroreductase with the antibiotic nitrofurazone. Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme. *J Biol Chem* 280:13256–13264
- Doherty A (1997) MOLSIM: molecular mechanics and dynamics simulation software—user's guide, version 3.2. The Chem21 Group Inc., Lake Forest
- Allinger NL (1977) Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J Am Soc* 99:8127–8134

35. Dewar MJS, Healy EF, Holder AJ, Yuan YC (1990) Comments on a comparison of AM1 with the recently developed PM3 method. *J Comput Chem* 11:541–542
36. Tokarski JS, Hopfinger AJ (1997) Prediction of ligand–receptor binding thermodynamics by free energy force field. *J Chem Inf Comput Sci* 37:792–811
37. Forsythe KH, Hopfinger AJ (1973) The Influence of solvent on the secondary structures of poly(L-alanine) and poly(L-proline). *Macromolecules* 6:423–437
38. Gaussian Inc. (1995–2003) Gaussian 03W for Windows, v.6. Gaussian Inc., Pittsburgh
39. Accelrys Inc. (2001) ViewerLite 4.2. Accelrys Inc., San Diego
40. McNaught AD, Wilkinson A, IUPAC (1997) Compendium of chemical terminology, 2nd edn (the “Gold Book”). Blackwell, Oxford (on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org>; created by Nic M, Jirat J, Kosata B, updates compiled by Jenkins A, ISBN 0-9678550-9-8; doi:[10.1351/goldbook](https://doi.org/10.1351/goldbook), 2006)