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

Pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofural potencialmente antichagásicos. Estudo de condições sintéticas para a primeira geração

Jeanine Giarolla

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira

SÃO PAULO
Novembro 2007

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013149

Ficha Catalográfica

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

Giarolla, Jeanine

G435p Pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofural
potencialmente antichagásicos. Estudo de condições sintéticas
para a primeira geração / Jeanine Giarolla. -- São Paulo,
2007.

155p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne

I. Latenciação : Química farmacêutica 2. Doenças de
Chagas I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

615.19 CDD

JEANINE GIAROLLA

Pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofural potencialmente antichagásicos. Estudo de condições sintéticas para a primeira geração

Comissão Julgadora

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Prof. Titular Elizabeth Igne Ferreira
Presidente e Orientadora

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, 19 de Outubro de 2007.

DEDICO ESTE TRABALHO:

Primeiramente à minha família:

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

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

Aos meus queridos irmãos Emanuel, Angélica, Gustavo, Ivelise e Lúcio Giarolla e sobrinho Pedro Picini que, apesar de estarmos separados pelas trajetórias de cada um, estão sempre presentes em meu pensamento. 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 namorado, Fabrício Vargas, pelos conselhos incentivadores nos momentos difíceis e de preocupações. Seu amplo conhecimento em Química me auxiliou na compressão de dúvidas que surgiram no decorrer deste trabalho. Saiba que seu apoio e paciência foram importantes durante a etapa final desta conquista.

A minha orientadora e “mamãe científica”, Professora Titular Elizabeth Igne Ferreira, primeiramente pela oportunidade de estar realizando um sonho da minha vida. Saiba que a senhora é meu exemplo de que podemos conquistar tudo que queremos, basta acreditar e se dedicar para que tudo aconteça. Muito obrigada pelo apoio, amizade, paciência e ensinamentos que levarei comigo pela vida inteira.

A Professora Dra. Maria Luiza Cruz por ter me apresentado à Química Farmacêutica. Sua paixão pela disciplina e pela ciência me contagiou e incentivou a minha dedicação nesta área tão interessante e maravilhosa. Tenho certeza que levarei comigo os valiosos conhecimentos que você me transmitiu.

AGRADECIMENTOS

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

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido.

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

À Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, pela amizade e sugestões que colaboraram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz, pelas contribuições nos estudos de fotoestabilidade do nitrofurais e seu derivado hidroximetilado.

A pesquisadora Dra. Carla M. S. Menezes pelo grande auxílio nos estudos de Modelagem Molecular.

À Kátia Cilene Alves Botelho, pela amizade e paciência com minhas dúvidas de pós-graduanda. Obrigada pela assistência no laboratório e por me ensinar técnicas tão importantes para a minha formação acadêmica.

Ao técnico Charles de Lima Brito, pelo auxílio técnico no laboratório.

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 Dra. Daniela Gonçalves Rando, por me ensinar a encarar a vida com alegria e descontração. Seus valiosos conselhos muito contribuíram para a minha formação científica e pessoal. Muito obrigada pela sua amizade.

À Carolina Horta Andrade, companheira de bancada, de sala de aula, de momentos de divertimento. Obrigada por me ajudar nos momentos que precisei e sempre estar à disposição para auxiliar nas horas mais difíceis.

Ao Gustavo Trossini, pela amizade e momentos de descontração, tão importantes para a união do grupo. Deixo aqui o meu muito obrigada.

À Patrícia Rivas, que tanto contribuiu nos ensaios de fotoestabilidade. Seus conhecimentos foram fundamentais para o desenvolvimento desta etapa do trabalho.

À amiga Maria Valéria Nani Rinaldi, pela amizade, preocupação e apoio.

Aos colegas Guilherme Matsutani e Mauro Aquiles, que colaboraram esclarecendo dúvidas que surgiram durante o mestrado.

Aos colegas de laboratório Hamilton, Priscila, Sun e Plínio, pela convivência e amizade.

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

À funcionária Raquel, por sempre transmitir tanta alegria.

A todos que, de certa forma, auxiliaram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

"As grandes coisas são feitas por pessoas que têm grandes idéias e saem pelo mundo para fazer com que seus sonhos se tornem realidade".

Ernest Holmes

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da tripanossomíase americana ou doença de Chagas. O vetor desta parasitose é um inseto hemíptero da família *Triatominae*, conhecido popularmente como barbeiro, chupões, chupança. A doença de Chagas 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 infecção. O problema desta patologia está na ausência de fármacos não tóxicos e ativos para a fase crônica da doença. O nifurtimox (retirado recentemente do mercado) e benznidazol, utilizados na terapêutica têm alta incidência de efeitos colaterais, o que compromete o tratamento. Face ao exposto, é necessária a pesquisa de novos agentes que sejam eficazes para a cura e bem-estar do paciente chagásico. À vista de tais fatos e utilizando-se o método de modificação molecular latenciação, o objetivo deste trabalho foi o estudo de condições sintéticas para pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofural potencialmente antichagásicos. O hidroximetilnitrofural tem mostrado atividade contra as formas amastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi in vitro*. Já os dendrímeros são novas arquiteturas moleculares, estruturas nanoscópicas, extremamente organizadas com massa molecular definida. Possuem diversas vantagens em relação aos polímeros tradicionais e podem atuar como agentes transportadores de fármacos, permitindo-lhes liberação controlada. Os estudos desenvolvidos acerca das condições reacionais para a obtenção do dendrímero de primeira geração mostraram a dificuldade em se obtê-los. O hidroximetilnitrofural apresentou baixa reatividade nas condições estudadas, o que conduz à necessidade de estudos adicionais sobre novas rotas para a síntese dos dendrímeros a partir dos ésteres desse derivado.

ABSTRACT

The *Trypanosoma cruzi* is an etiological agent of American tripanosomiasis or Chagas' disease. The vector of this parasitic disease is a hemipter insect from *Triatominae* family, known popularly as barber. Chagas' disease occurs from the South of USA to the South of Argentina and about 20 million of people in Latin America are under the risk of acquiring the infection. The problem of this pathology is the absence of non toxic and active drugs for its chronic phase. Nifurtimox (recently removed from the market) and benznidazole, the only that has been available for therapeutics have high incidence of side effects. So, the research of new agents for the cure and welfare of the patient is needed. Taking into account such facts and employing a process of molecular modification, named latentiation, the aim of this work was the study of the synthetic conditions for obtaining potentially antichagasic dendrimeric prodrugs of hydroxymethylnitrofurazone. The hydroxymethylnitrofurazone showed to be active against the trypomastigotes and amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi in vitro*. On the other hand, the dendrimers are new molecular architecture, nanoscopic structure extremely organized with defined molecular weight. They have a wide range of advantages related to traditional polymers and can act as drug carriers, towards drug controlled release. The studies developed concerning the reaction conditions for the attainment of the first generation of dendrimer showed the difficulty in obtaining these prodrugs. The hydroxymethylnitrofurazone presented low reactivity in the studied conditions, which leads to the necessity of developing further studies about new synthetic routes for obtaining dendrimers from its ester derivative.

SUMÁRIO

1 Introdução	1
1.1 Doença de Chagas	1
1.1.1 Agente etiológico	1
1.1.2 Fases da doença de Chagas	4
1.1.3 Diagnóstico	6
1.1.4 Epidemiologia	7
1.1.5 Quimioterapia	8
1.1.5.1 Tripanomicidas atualmente utilizados	8
1.1.5.1.1 Nifurtimox	9
1.1.5.1.2 Benznidazol	9
1.1.5.2 Tripanomicidas em estudo	10
1.1.5.2.1 Nitrofurais	10
1.1.5.2.2 Alopurinol	11
1.1.5.2.3 Cetoconazol, itraconazol	11
1.1.5.2.4 Derivados aminoquinolínicos	12
1.1.5.2.5 Megazol	12
1.1.5.3 Fármacos derivados de substâncias naturais	13
1.1.6 Alvos promissores para terapia antichagásica	13
1.1.7 Estratégias para a doença de Chagas	15
1.2 Planejamento de novos fármacos	16
1.2.1 Latenciação	16
1.2.1.1 Dendrímeros	19
1.2.1.1.1 Dendrímero de poliamidoamina (PAMAM)	21
1.2.1.1.2 Aplicações dos dendrímeros	23
1.2.1.1.3 Síntese dos dendrímeros	26
1.3 Modelagem Molecular	27
1.3.1 Parâmetros úteis para a modelagem molecular	30
2 Objetivo e justificativa	31

3 Material e Métodos	34
3.1 Material	34
3.1.1 Reagentes e solventes	34
3.1.2 Equipamentos	35
3.1.3 <i>Software</i> para modelagem molecular	36
3.2 Métodos	37
3.2.1 Modelagem Molecular (MM)	37
3.2.2 Síntese	39
3.2.2.1 Obtenção do derivado hidroximetilnitrofural (NFOH)	39
3.2.2.1.1 Planejamento fatorial 3 ² da síntese do NFOH	39
3.2.2.2 Obtenção do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético (ácido málico protegido)	40
3.2.2.3 Síntese do intermediário de hidroximetilnitrofural e ácido málico protegido	44
3.2.2.4 Síntese do intermediário inositol e ácido málico protegido	45
3.2.2.5 Síntese do intermediário inositol e ácido L(-)-málico	48
3.2.2.6 Síntese do dendrímero de primeira geração	49
3.2.2.7 Esterificação do derivado hidroximetilnitrofural	51
3.2.2.7.1 A partir do hidroximetilnitrofural	51
3.2.2.7.2 A partir de um anidrido misto	54
3.2.2.7.3 Esterificação de NFOH com éster do ácido málico protegido com <i>p</i> -nitrofenol	54
3.2.2.7.4 A partir do clorometilnitrofural	56
3.2.2.7.5 A partir do nitrofural	56
3.2.2.8 Síntese do dendrímero formado pelo inositol, ácido málico e cloranfenicol	59
3.2.2.8.1 Síntese do intermediário ácido málico protegido e cloranfenicol	59
3.2.2.8.2 Desproteção do intermediário cloranfenicol e ácido málico protegido	60
3.2.2.8.3 Obtenção do dendrímero de primeira geração	60

3.2.3 Análise	61
3.2.3.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C	61
3.2.3.2 Cromatografia	61
3.2.3.2.1 Em camada delgada (CCD)	61
3.2.3.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	61
3.2.3.4 Ensaios de fotoestabilidade do NF e NFOH	62
4 Resultados e Discussão	63
4.1 Modelagem Molecular	63
4.2 Planejamento fatorial 3^2 da síntese do NFOH	77
4.3 Métodos utilizados na tentativa de obtenção do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético	85
4.4 Síntese do intermediário de hidroximetilnitrofural ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético	91
4.5 Síntese do intermediário inositol e ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético	93
4.6 Síntese do dendrímero de primeira geração	107
4.7 Esterificação do derivado hidroximetilnitrofural	108
4.8 Síntese do anidrido do ácido málico protegido	115
4.9 Síntese do intermediário ácido L(-)-málico e NFOH, a partir de um anidrido misto	116
4.10 Síntese do intermediário ácido málico protegido e <i>p</i> -nitrofenol	116
4.11 Halogenação do NFOH	118
4.12 Halogenação e alquilação do NF	120
4.13 Síntese do dendrímero formado pelo inositol, ácido málico e cloranfenicol (Patente)	122
4.13.1 Síntese do intermediário ácido málico protegido e cloranfenicol	123
4.13.2 Desproteção do intermediário cloranfenicol e ácido málico protegido	125
4.13.3 Obtenção do dendrímero de primeira geração	127
4.14 Ensaios de fotoestabilidade do NF e NFOH	128

5 Conclusão	134
6 Perspectivas	135
7 Referências Bibliográficas	136
Apêndice A	154
A.1 Atividades Científicas	154

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

1.1.1 Agente etiológico

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Figura 1) é o agente etiológico da tripanossomíase americana, esquizotripanose ou doença de Chagas. Esse protozoário hemoflagelado e a doença foram descritos e descobertos por Carlos Chagas, em 1909 (NEVES *et al.*, 2000). Os vetores da doença são insetos hemípteros, da família *Reduviidae* e subfamília *Triatominae*.

FIGURA 1 - *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: http://www.iabc.cz/images/tistene_ABC/17/04_BUNKY_ISIFASPL.jpg

Pode-se dizer que o *Triatoma infestans* (*T. infestans*) (Figura 2) foi o maior responsável pela transmissão da doença de Chagas no Brasil (e também em todo Cone Sul), chegando a se dispersar em mais de 720 municípios de nosso País. No Brasil, são vulgarmente apelidados de barbeiros, chupões, fincóes, bicudos, chupanças, procotós, entre outros (VERONESI, FOCACCIA, 2004). A principal característica biológica dos *Triatominae* é que todas as espécies são obrigatoriamente hematófagas, pois as cinco fases ninfais necessitam do repasto de sangue para completar o seu desenvolvimento. É fato conhecido que, em todos os estágios de desenvolvimento e nos imagos, os triatomíneos podem ser infectados e transmitir o *T. cruzi* aos hospedeiros vertebrados (BRENER, ANDRADE, BARRAL, 2000).

FIGURA 2 - *Triatoma infestans*.

Fonte: http://www.sucen.sp.gov.br/doencas/chagas/texto_galeria_t_infestans.htm

Na natureza, o *T. cruzi* infecta homens, vetores, reservatórios silvestres e animais domésticos. Este flagelado possui diferentes formas morfológicas e funcionais relacionadas com os hospedeiros vertebrados (tripomastigotas e amastigotas) e invertebrados (epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos) (GARCIA, AZAMBUJA, 1991) (figura 3). Na fase crônica da doença de Chagas, pequeno número de tripomastigotas sangüíneos encontra-se no sangue circulante do paciente e, se alguns deles forem ingeridos durante a alimentação, podem infectar o vetor. A primeira diferenciação do parasita ocorre no estômago: o tripomastigota transforma-se em epimastigota poucas horas após a sua ingestão (GARCIA, DVORAK, 1982; GARCIA, AZAMBUJA, 1991). A segunda diferenciação do parasita no tubo digestivo do vetor dá-se quando os epimastigotas transformam-se em tripomastigotas metacíclicos (as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado). Essa diferenciação ocorre predominantemente no final do intestino e no reto. Os tripomastigotas metacíclicos são liberados nas fezes e atingem o hospedeiro vertebrado por uma ferida na pele ou através da mucosa. Os parasitas invadem diferentes tipos de células no hospedeiro, rapidamente se diferenciam em amastigotas, que sofrem várias divisões, como amastigotas, no interior das células infectadas. Posteriormente, os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas, que são liberados para o sangue após ruptura da membrana celular, iniciando o próximo ciclo de infecção de outras células ou ciclo biológico do parasita quando ingerido pelo vetor (BRENER, 1973; GARCIA, AZAMBUJA, 1991).

FIGURA 3 - Diferentes estágios de desenvolvimento do *T.cruzi* (BUSCAGLIA, NOIA, 2003).

Embora a transmissão da doença de Chagas pelo vetor domiciliar *T. infestans* seja a mais comum, outras maneiras de aquisições podem ser responsáveis por novos casos de infecção por *T. cruzi*, como por exemplo, pela rota digestiva. A contaminação de alimentos por vetores silvestres e reservatórios vertebrados por este protozoário é provavelmente um importante fator para a transmissão digestiva da doença de Chagas (CAMANDAROBA, PINHEIRO, ANDRADE, 2002). A ocorrência de casos graves de infecção, conduzindo à morte de uma porcentagem de indivíduos infectados (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991; PINTO *et al.*, 2001), indica patogenicidade elevada do parasita e sua capacidade de penetrar na mucosa gástrica, passando de maneira uniforme 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.

1.1.2 Fases da doença de Chagas

A fase aguda da doença 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 - Figura 4). Pode haver miocardite aguda, com reação inflamatória intensa adjacente à ruptura do alojamento dos parasitas e danos nos tecidos musculares. 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).

FIGURA 4 - Edema de pálpebras (Sinal de Romaña).

Fonte: <http://www.cpqrr.fiocruz.br>

A fase crônica inicia-se aproximadamente dois meses após infecção inicial, quando os parasitas não são facilmente detectáveis no sangue, porém testes sorológicos podem tornar-se positivos. Esta fase é subdividida em: formas indeterminada, cardíaca e digestiva com base nas características clínicas de cada etapa (UMEZAWA *et al.*, 2000). A forma crônica da doença de Chagas afeta número significativo de indivíduos na América Latina, principalmente de populações socialmente marginalizadas. Cerca de 25-30% dos casos evoluem para patologias irreversíveis, levando a consideráveis índices de mortalidade e morbidade (WHO, 2002b). A doença de Chagas, segundo a Organização Mundial de Saúde, constitui uma das principais causas de morte súbita, que pode ocorrer na fase mais produtiva do cidadão (NEVES *et al.*, 2000).

A forma indeterminada da doença de Chagas inicia-se por volta de quatro a dez semanas após o contágio inicial. Esta etapa é caracterizada pela ausência de sinais e sintomas característicos da patologia, eletrocardiograma e estudos radiológicos do sistema digestivo normais. Alguns indivíduos podem permanecer neste estágio, porém outros, após 10 a 20 anos, podem evoluir para a forma crônica determinada (RIBEIRO, ROCHA, 1998). O paciente nesta fase da doença apresenta bom estado de saúde, podendo ser desconhecida a infecção. Sendo assim, a importância desta etapa é epidemiológica (LARANJA *et al.*, 1956). Aproximadamente 50% dos indivíduos chagásicos apresentam este tipo de infecção (MACEDO, 1980).

As manifestações digestivas estão relacionadas principalmente com o megaesôfago e megacólon (Figura 5), porém as anormalidades do sistema entérico podem ser encontradas ao longo de todo o intestino (KÖBERLE, 1968; REZENDE, RASSI, 1983). Estas anormalidades são degenerações e reduções do número intrínseco de neurônios mioentéricos (KÖBERLE, NADOR, 1955; REZENDE, RASSI, 1958; CHAPADEIRO *et al.*, 1964). 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).

Os principais sintomas relacionados com a esofagopatia chagásica são: disfagia, regurgitação, dor esofagiana, pirose ("queimação"), singulto ("soluço"), tosse, constipação intestinal, sialose (salivação excessiva), hipertrofia das glândulas salivares e desnutrição. As sintomatologias mais comuns em pacientes com megacólon são: obstipação, meteorismo (presença incômoda de gases), disquezia, dores no abdome, intoxicação crônica, desnutrição (REZENDE, MOREIRA, 2000).

FIGURA 5 - Megacólon causado pela degeneração do plexo de Auerbach e Meissner (UMEZAWA *et al.*, 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).

O mecanismo pelo qual a infecção por *T. cruzi* causa lesões na fase crônica da doença, incluindo danos no sistema nervoso entérico, é desconhecido. Diversas evidências suportam a hipótese de que a resposta imunológica é a principal causa da fase crônica da doença (ANDRADE, ANDRADE, 1966). De fato, o controle da parasitemia na fase aguda e as ocorrências graves da fase crônica parecem estar relacionadas a respostas celulares e humorais específicas ao parasita desenvolvidas pelo indivíduo infectado. Além disso, dados experimentais mostram a importância da carga parasitária na presença de diferentes sub-populações de linfócitos T para fase crônica da doença de Chagas (TARLETON *et al.*, 1994).

1.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial deve ser direcionado para a fase em que a doença se encontra. Para a fase aguda, o exame é parasitológico, buscando encontrar o *T. cruzi* (LUQUETTI, RASSI, 2000). A forma crônica é normalmente confirmada pela presença de anticorpos IgG para o *T. cruzi* no soro do paciente (UMEZAWA *et al.*, 1996), com ELISA, imunofluorescência ou teste de hemaglutinação. Reações falso-positivas podem ser observadas (especialmente em pacientes com leishmaniose), porém podem ser evitadas com o uso de proteínas recombinantes do *T. cruzi*, mucinas purificadas ou por meio de ensaios de *western-blot* para antígenos do parasita. A técnica de PCR é útil quando o *T. cruzi* não é identificado na fase crônica (UMEZAWA *et al.*, 2000).

O xenodiagnóstico é realizado com as ninfas do triatomíneo não-infectadas com *T. cruzi*. O exame consiste basicamente na alimentação das ninfas com o sangue do paciente. Após 30 a 60 dias do repasto sangüíneo, as fezes do inseto serão

examinadas. A xenocultura é o cultivo das fezes dos triatomíneos (LUQUETTI, RASSI, 2000).

1.1.4 Epidemiologia

A doença de Chagas ocorre desde o sul dos EUA até o sul da Argentina (Figura 6) e continua sendo um grave problema de saúde pública em muitos países e regiões. Além disso, 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 será especialmente relevante no contexto de aquisição da enfermidade através de transfusão sanguínea, porém grandes avanços têm sido observados no controle transmissão vetorial e transfusional da doença, reduzindo o número de risco de 100 milhões para 40 milhões de pessoas (MOREL, 2000; WHO, 2002b; VINHAES, SCHOFIELD, 2003). A estimativa de infecção humana por *T. cruzi* é de 16-18 milhões de casos. Aproximadamente 20 milhões de pessoas correm risco de contrair a infecção (WHO, 2002a). Dados recentes indicam que existem cerca de 200.000 novos casos por ano e 21.000 mortes associadas a esta patologia (MOREL, 2000; WHO, 2002b). Embora o *T. infestans*, principal vetor da doença, esteja sob controle no Uruguai, Chile, Brasil e em muitas regiões endêmicas da Argentina, outras espécies de triatomíneos continuam transmitindo a infecção na América Latina (URBINA, DOCAMPO, 2003).

FIGURA 6 – Distribuição geográfica da doença de Chagas.

Fonte: <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:CartemaladieChagas.png>

1.1.5 Quimioterapia

1.1.5.1 Tripanomicidas atualmente utilizados

A terapêutica da doença de Chagas continua parcialmente ineficaz, apesar dos grandes esforços que vêm sendo desenvolvidos para resolver este problema. Nenhum dos fármacos utilizados no tratamento consegue promover cura definitiva em todos os pacientes tratados (NEVES *et al.*, 2000; COURA, CASTRO, 2002; URBINA, DOCAMPO, 2003).

Cepas isoladas de pacientes, reservatórios e vetores silvestres mostram-se naturalmente resistentes aos fármacos em condições experimentais, o que também explicaria a ocorrência de falha na terapêutica no tratamento dos pacientes (NEVES *et al.*, 2000).

Para a doença de Chagas, dispõe-se, atualmente, de dois fármacos: nifurtimox e benznidazol.

1.1.5.1.1 Nifurtimox

O nifurtimox é eficaz somente em alguns casos do estágio agudo da doença em crianças e adolescentes, sendo mais ativo nas cepas de parasitas argentinas ou chilenas do que nas brasileiras, devido à diversidade genética do parasita (KOROLKOVAS, 1988). Os efeitos colaterais podem ser: anorexia, perda de peso, alterações físicas, excitabilidade, problemas relacionados ao sono e manifestações digestivas, como náuseas, vômitos e ocasionalmente cólicas intestinais e diarreia (COURA, CASTRO, 2002). A ação tripanocida do nifurtimox parece estar relacionada à sua capacidade de sofrer redução parcial do ânion nitro radical, seguido de auto-oxidação para regenerar o nitrofurano original e formar o radical ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (GILMAN *et al.*, 1996). Este fármaco não está atualmente disponível no Brasil (RSBMT, 2006).

nifurtimox

1.1.5.1.2 Benznidazol

O benznidazol mostra-se ativo nas fases aguda e crônica da doença (KOROLKOVAS, 1988; FRANÇA, 2004), mas especialmente na primeira. Os efeitos colaterais observados são sintomas de hipersensibilidade, dermatites com erupções cutâneas (normalmente aparecendo entre o sétimo e décimo dia de tratamento), edema generalizado, linfadenopatia, dores musculares e articulares, púrpura trombocitopênica e agranulocitose, entre outros (COURA, CASTRO, 2002). A ação biológica dos nitrocompostos é dependente da redução do grupo nitro. O nitro radical aniônico e o

derivado hidroxilamínico são os principais intermediários responsáveis pela ação citotóxica dos nitroimidazóis e acredita-se que o DNA seja o principal alvo destes produtos de redução (LA-SCALEA, 1998).

benznidazol

1.1.5.2 Tripanomicidas em estudo

Derivados de diversas classes químicas e/ou terapêuticas são ensaiados com vistas à avaliação da atividade antichagásica e muitos deles mostram-se ativos contra a parasitose.

1.1.5.2.1 Nitrofurais

O nitrofurais (NF) foi empregado primeiramente no tratamento de infecções decorrentes de queimaduras e em outras infecções, durante a Segunda Guerra Mundial. À essa época, observou-se atividade antimicrobiana de amplo espectro e baixa incidência de sensibilização (CRENSHAW *et al.*, 1976). Em 1988, HENDERSON e colaboradores, estudando a tripanotona redutase, observaram que derivados de naftoquinona e nitrofurais, incluindo o nitrofurais, apresentavam a capacidade de inibir esta enzima.

nitrofurais

1.1.5.2.2 Alopurinol

Este fármaco tem sido usado por muitas décadas para o tratamento de gota em humanos, pois é transformado nos vertebrados em oxipurinol, potente inibidor da xantina oxidase. Em tripanossomatídeos, que são deficientes em xantina oxidase, o alopurinol age como análogo de purina e é incorporado, pela HGPRT (hipoxantina-guanina fosfo-ribosiltransferase), no DNA do parasita, modificando a síntese de RNA e de proteínas (STOPPANI, 1999).

alopurinol

1.1.5.2.3 Cetoconazol, itraconazol

T. cruzi requer esteróis específicos para a viabilidade celular e proliferação em todos os estágios de seu ciclo de vida. Os parasitas são extremamente suscetíveis a inibidores da biossíntese de ergosterol, que agem em diferentes níveis dessa etapa metabólica *in vitro* (URBINA, 2001; 2002). O cetoconazol e o itraconazol, que apresentam como mecanismo de ação a interferência na síntese de ergosterol (De CASTRO, 1993), não são potentes o suficiente para eliminar o *T. cruzi* de infecções crônicas em animais e humanos, mas inibem a progressão da doença (URBINA, 2001, 2002).

cetoconazol

itraconazol

1.1.5.2.4 Derivados Aminoquinolínicos

Algumas quinolinas, como a primaquina, têm sido estudadas como fármacos potenciais para a doença de Chagas (BRENER, 1979). A ação da primaquina contra epimastigotas envolve a formação de radicais livres e este fármaco apresenta efeito sinérgico com cetoconazol, diminuindo a parasitemia de ratos infectados experimentalmente (AUGUSTO, 1988). Dipeptídeos derivados de primaquina foram sintetizados como pró-fármacos e mostraram-se ativos em cultura de células infectadas com *T. cruzi* (CHUNG *et al.*, 1997).

primaquina

1.1.5.2.5 Megazol

O megazol [2-amino-5(1-metil-5-nitro-2-imidazol)-1,3,4-tiadiazol)] é um derivado nitroimidazol-tiadiazólico, que apresenta espectro amplo de atividades antibacteriana e antiparasitária (BURDEN, RACETTE, 1968). Este fármaco pode causar mutagenicidade e toxicidade em animais, apesar de seu perfil antiprotozoário estar associado com o metabolismo de oxigênio do *T. cruzi* e interferência com os grupos tiol da tripanotona, cofator da tripanotona redutase (CARVALHO *et al.*, 2003).

megalazine

1.1.5.3 Fármacos derivados de substâncias naturais

A atividade de série de alcalóides, taxóides, naftoquinonas e seus derivados sintéticos e outros grupos de quinonas isoladas de produtos naturais tem sido avaliada para ação contra o *T. cruzi* (COURA, CASTRO, 2002).

1.1.6 Alvos promissores para a quimioterapia antichagásica

Estudos recentes de bioquímica básica do *T. cruzi* têm identificado novos alvos para a quimioterapia da doença de Chagas. Estes compreendem: metabolismo de esteróis, enzimas como cisteína protease, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, DNA topoisomerase e diidrofolato redutase (DoCAMPO, 2001; RODRIGUEZ, 2001).

A cruzipaina, membro da família das cisteíno proteases, é responsável pela maioria das atividades proteolíticas de todos os estágios do ciclo de vida do parasita (CAFFREY, SCORY, STEVERDING, 2000). Inibidores seletivos desta protease, tais como peptidil diazometilcetonas, peptidil fluormetilcetonas e peptidil vinilsulfonas (McKERRROW, 1999), bloqueiam a proliferação de epimastigotas e amastigotas e interrompem a metaciclogênese (transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos) *in vitro*, mostrando que a enzima é fundamental para a sobrevivência do parasita (CAFFREY, SCORY, STEVERDING, 2000).

As células possuem duas classes de compostos químicos de baixa massa molecular, poliaminas e compostos contendo tiol, para exercer grande parcela de suas funções biológicas. Basicamente, as poliaminas estão relacionadas com a síntese de proteínas, crescimento e desenvolvimento celular (MARTON, PEGG, 1995), enquanto que as glutatona peptídeo (L-γ-glutamil-L-cisteinilglicina) estão envolvidas na manutenção do balanço redox em diversos aspectos do metabolismo (DOLPHIN,

POULSON, AVRAMOVIC, 1989). A forma tiol da glutathiona, GSH, atua como agente protetor, mantendo o potencial de redução no ambiente intracelular. GSH é oxidada em dissulfeto de glutathiona (GSSG) seguindo reações com radicais potencialmente prejudiciais e oxidantes. A enzima glutathiona redutase (GR) é responsável por manter o nível elevado de tiol, por catálise e redução do dissulfeto (BOND *et al.*, 1999).

Tripanossomatídeos utilizam adutos de poliamina-glutathiona, ao invés do GSH, com função similar de proteção e manutenção do ambiente intracelular. Três tipos de adutos têm sido identificados: tripanotiona, glutathionilespermidina e homotripanotiona (FAIRLAMB, CERAMI, 1992). Semelhanças estruturais com a glutathiona sugerem que estes metabólitos poderiam apresentar função similar para seqüestrar radicais livres e espécies reativas de oxigênio formados pelos processos metabólicos ou pela exposição do parasita ao estresse oxidativo originado da resposta imune do hospedeiro. Os adutos também têm a função de regular os níveis de poliaminas, exercer influência no crescimento celular desenvolvimento. Tripanossomas possuem baixos níveis de glutathiona e não contêm GR. A enzima tripanotiona redutase (TR) (Figura 7) é responsável pela conversão de dissulfeto de tripanotiona (T[S]2) para a forma di-tiol, diidrotripanotiona (T[SH]2). A forma di-tiol pode reduzir GSSG para GSH por alterações no tiol-dissulfeto (FAIRLAMB, CERAMI, 1992). GR humano e TR são NADPH-dependente, contendo flavina-dissulfeto oxirredutase. Estas enzimas funcionam como homodímeros, que atuam em moléculas de massa molecular por volta de 52-54 kDa e estão relacionadas com cerca de 30% da seqüência da identidade. Os resíduos envolvidos nesta catálise são conservados, mas observações mostram que cada enzima é específica para seu substrato, desprezando semelhanças estruturais (HENDERSON *et al.*, 1987; FAIRLAMB, CERAMI, 1992). Isto indica que seria possível inibir a TR do parasita não interferindo na GR do hospedeiro. Além disso, estudos moleculares genéticos indicam que a TR é essencial para o crescimento e sobrevivência do parasita (DUMAS *et al.*, 1987; TOVAR *et al.*, 1998; TOVAR *et al.*, 1998). Sendo assim, a TR e o metabolismo da tripanotiona são alvos para fármacos desenvolvidos especificamente para esta rota metabólica do *Trypanosoma* (BOND *et al.*, 1999).

FIGURA 7 – Organização do dímero de TR do *T. cruzi* (adaptado de BOND *et al.*, 1999).

1.1.7 Estratégias para o controle da doença de Chagas

As principais estratégias para controle da doença de Chagas no período de 1996-2010 são: controle do vetor e seleção controlada de doadores de sangue nos países endêmicos. Os vetores podem ser controlados com o uso de inseticidas (em locais domiciliares ou não, dependendo da região a ser considerada). A aquisição da patologia pela transfusão de sangue é a segunda rota principal para a infecção pelo *T. cruzi*. Nos países da América do Sul e três da América Central, 100% dos doadores são selecionados. A taxa de infecção por transfusão de sangue varia de 0,1-4,2% na Argentina, Brasil, Chile e Uruguai e pode atingir valores superiores a 24,4% na Bolívia (WHO, 2002a). Além destas estratégias, deve-se considerar o planejamento de novos fármacos, que constitui uma promissora alternativa no combate à doença de Chagas.

1.2 PLANEJAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

A modificação molecular tem se mostrado o processo mais promissor para a introdução de novos fármacos na terapêutica (KOROLKOVAS, 1988; MEYER, 1996; BARREIRO, FRAGA, 2001; WERMUTH, 2003). Tal processo permite que as propriedades indesejáveis dos protótipos sejam diminuídas e as características desejáveis, ressaltadas, mediante retirada, substituição ou 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. Dentre os métodos de planejamento de novos fármacos, destaca-se a latenciação.

1.2.1 Latenciação

Entre os processos de modificação molecular, merece realce a latenciação (BUNDGAARD, 1985; TESTA, CALDWELL, 1996; CHUNG, FERREIRA, 1999; WERMUTH, 2003; ETTMAYER *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005). Esse método 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. 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 latência clássica. F – fármaco; T- transportador (Adaptado de FRIIS, BUNDGAARD, 1996).

Alguns pró-fármacos, cuja denominação coube a Albert, em 1957, foram sintetizados antes que o conceito fosse introduzido por Harper, em 1958.

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

Especialmente no caso de pró-fármacos clássicos e bioprecursores, o planejamento 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 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 EM ligação covalente entre o grupo ativo e o transportador, mas alguns autores também usam-no 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 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, no presente (ETTMAYER *et al.*, 2004).

Os pró-fármacos clássicos podem ser subdivididos em duplos ou triplos, ou em cascata e pró-fármacos recíprocos. 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 enzimática.

Pró-fármaco recíproco é o termo aplicado à forma latente, que consiste de dois fármacos, em geral sinérgicos, ligados um ao outro (um fármaco é transportador de outro e vice-versa) (SINGH, SHARMA, 1994). Tal conceito não é recente, mas, não raro, confunde-se com hibridação molecular, que é processo de associação molecular (KOROLKOVAS, 1988). Entre os exemplos mais recentes podem-se citar as cefalosporinas de ação mista, conhecidas como DAC – *Dual Action Cephalosporins* –, cujo propósito é ampliar o espectro de ação das mesmas.

Sistema misto, em que o transportador deve ser biotransformado antes de permitir a liberação do fármaco e que se presta a conferir especificidade de localização por meio de alteração das propriedades físico-químicas, é o CDS – *Chemical Delivery System*. Tal sistema, idealizado por Bodor, Farag e Brewster, em 1981, permite atingir, por exemplo, altas concentrações cerebrais de fármacos que devem atuar especialmente em disfunções cerebrais (PROKAI, PROKAI-TATRAI, BODOR, 2000).

Bioprecursor é um tipo de pró-fármaco, em que a reversão ao composto ativo se dá por meio de reações enzimáticas, em geral, não-hidrolíticas (WERMUTH, 2003). Sistemas de óxido-redução são utilizados pelo organismo para liberar o fármaco. Nesses casos, não se utilizam transportadores. Há, no entanto, formas mistas de bioprecusores e pró-fármacos clássicos.

Fármacos dirigidos são formas latentes em que o transportador apresenta alta especificidade, por si só, ou por conter grupo diretor da ação ao nível celular (TAKAKURA, HASHIDA, 1995; SCHACHT, VANSTEENKISTE, SEYMOUR, 1996; TAKAKURA *et al.*, 1996). Anticorpos, imunoglobulinas e ácidos nucleicos podem ser

empregados como transportadores, normalmente ligados a matrizes poliméricas. Também, outros grupos diretores, como oligossacarídeos, que interagem com receptores celulares específicos, podem ser utilizados com o mesmo objetivo.

Variante de grande especificidade de ação, que engloba a concepção de fármaco dirigido, é a do processo ADEPT – *Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy* (HAN, AMIDON, 2000). Por esse planejamento, inicialmente se administra um conjugado anticorpo monoclonal-enzima não existente no organismo, e, em seguida, pró-fármaco, cuja ligação ao transportador é cindida especificamente pela enzima componente do conjugado.

Mais avançado e recente que o ADEPT é o GDEPT (HAN, AMIDON, 2000) – *Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy* –, cujas bases se encontram na genética, e vem sendo estudado em tumores. Embora ainda de difícil aplicação, face à complexidade de sua constituição, compreende a incorporação na célula, por diferentes meios, do gene que codifica determinada enzima, que passa a ser produzida em grande quantidade. Os bioprecusores, ou pró-fármacos clássicos, administrados em seguida são alvo dessa enzima e atingem, portanto, a seletividade de ação.

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

1.2.1.1 Dendrímeros

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). Constituem-se novas classes de materiais poliméricos cuja estrutura tem um grande impacto em suas propriedades físicas e químicas (KLAJNERT, BRYSEWSKA, 2001).

A importância desta nova classe de materiais está na capacidade de se obter estruturas controladas, 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). A nanotecnologia enfoca não somente formulações para agentes terapêuticos em nanocompostos biocompatíveis, mas também explora as vantagens associadas com a utilização de moléculas com escalas dimensionais reduzidas dentro de 1-100 nm (QIU, BAE, 2005).

O dendrímero é um composto extremamente ordenado. A estrutura da molécula é dividida em 3 regiões distintas: um foco central, camada de ligações repetidas partindo do centro e grupos funcionais na camada externa das unidades repetidas (GRAYSON, FRÉCHET, 2001).

As características do centro do dendrímero determinam 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. Como resultado, os dendrímeros podem apresentar disposições diversas de tamanhos, formas, grupos químicos internos e superfície que permitam a ligação e descoberta de novos fármacos (MACCARTHY *et al.*, 2005).

As propriedades dos dendrímeros (isto é, 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).

A estrutura nanoscópica tridimensional das gerações mais elevadas dos dendrímeros sugere que esta classe de moléculas sintéticas pode mimetizar o comportamento de proteínas (FARIN, AVNIR, 2001). Porém, algumas diferenças entre dendrímeros e proteínas devem ser consideradas. Primeiramente, as proteínas são formadas por cadeias de polipeptídeos lineares, ao passo que a arquitetura ramificada do interior dos dendrímeros, composta por ligações covalentes, faz com que os mesmos adquiram a forma globular devido às interações entre seus *dendrons*, diminuindo sua flexibilidade. Em adição, os dendrímeros são menos compactos que as proteínas. Além disso, contêm número maior de grupos funcionais periféricos quando comparados com proteínas de massa molecular equivalente (BOAS, HEEGAARD,

2004). Dendrímeros são similares no tamanho e na forma a algumas moléculas biológicas; por exemplo, insulina (30 Å), citocromo C (40 Å) e hemoglobina (55 Å) têm características próximas às gerações 3, 4 e 5 dos dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM). Em contraste, as gerações 5 e 6 de PAMAM têm diâmetros aproximadamente equivalentes aos da bicamada lipídica das membranas celulares (ESFAND, TOMALIA, 2001).

Comparados aos polímeros tradicionais, os dendrímeros apresentam estruturas perfeitamente controladas (LIU, FRÉCHET, 1999). Macromoléculas poliméricas geralmente são heterogêneas e por seus componentes não se encontrarem bem definidos, sua reprodutibilidade e integridade são limitadas. Além disso, devido à flexibilidade da matriz polimérica, as estruturas tridimensionais são variadas e difíceis de serem previstas (ZENG, ZIMMERMAN, 1997). A síntese de polímeros pode fornecer produtos polidispersos, com massas moleculares diferentes. Estes, em geral, não são estruturas arquitetônicas macromoleculares controladas (ESFAND, TOMALIA, 2001). Em contraste, os dendrímeros são freqüentemente monodispersos e as estruturas podem ser facilmente obtidas (ZENG, ZIMMERMAN, 1997).

A arquitetura dos dendrímeros pode proporcionar diversas vantagens em relação aos polímeros, como em sistema de transportes de fármacos. Primeiramente, a cavidade interna do dendrímero permite liberação controlada de fármacos encapsulados não-covalentemente. Em adição, os grupos de superfície dos dendrímeros podem estar ligados a fármacos, grupos alvos ou que aumentem a solubilidade destes compostos. Em terceiro, a forma globular dos dendrímeros, em relação à estrutura aleatória da maioria dos polímeros lineares, poderia afetar suas propriedades biológicas, originando comportamento farmacocinético reprodutível. Além disso, ao contrário das estruturas poliméricas, as dendríticas são estáveis, pois elas são covalentemente limitadas e não se dissociam (QIU, BAE, 2005).

1.2.1.1.1 Dendrímero de Poliamidoamina (PAMAM)

Foi o primeiro dendrímero a ser completamente sintetizado por abordagem divergente, caracterizado e comercializado (ESFAND, TOMALIA, 2001). Estes

compostos apresentam baixa imunogenicidade e toxicidade em células mamíferas, principalmente quando a superfície contém grupos aniônicos (tais como carboxilas e hidroxilas) ou neutros (CAI *et al.*, 2003).

A síntese envolve um centro com uma amina funcional, que reage com metilacrilato. Como resultado, há a formação de duas ramificações por grupo amina, com origem de um dendrímero com terminação éster, chamado “metade da geração” do dendrímero. Subseqüentes reações com éster metílico e etilenodiamina formarão o dendrímero completo com terminações aminas. A ampliação das gerações dos dendrímeros gera aumento de massa molecular, número de grupos funcionais terminais e tamanho (PATRI, MAJOROS, BACKER, 2002). A Figura 9 apresenta a estrutura do PAMAM.

FIGURA 9 - Dendrímero de Poliamidoamina (PAMAM) geração 2.

Fonte: <http://www.dendritech.com/pamam.html>

As dimensões dos dendrímeros estão relacionadas com o número de gerações (G) destes compostos. O dendrímero de PAMAM é um exemplo típico a ilustrar esta afirmação. Os diâmetros das moléculas esféricas do PAMAM são 40, 53, 67 e 80 Å, proporcional ao número das gerações 4, 5, 6 e 7, respectivamente (ESFAND, TOMALIA, 2001). Quando fármacos estão incorporados nos dendrímeros, espera-se

que gerações relativamente maiores apresentem aumento nos valores na escala dimensional, especialmente quando ligações hidrogênio ou interações hidrofóbicas influenciam nas relações entre os *dendrons* (JANSEN, De BRABANDER-VAN DEN BERG, 1994; OOYA, LEE, PARK, 2003). Dados experimentais mostram que as gerações dendriméricas podem afetar a liberação dos fármacos de alguma maneira. O dendrímero de PAMAM é um exemplo, no qual as ampliações destes compostos os transformam de moléculas flexíveis (G0 a G3) a estruturas semi-rígidas (G4-G6). Em contraste, superfícies rígidas de (G7-G10) mostram permeabilidade de superfície limitada, necessária para a liberação de fármacos (ESFAND, TOMALIA, 2001).

1.2.1.1.2 Aplicações dos dendrímeros

O potencial dos dendrímeros como agentes transportadores tem sido estudado. Os dendrímeros de PAMAM, por exemplo, mostraram-se muito eficientes na transferência de DNA em uma variedade de cultura de células de mamíferos. Também podem ser utilizados para a obtenção de imagens em ressonância magnética, por apresentarem grupos reativos nas porções terminais. Devido à estrutura definida, forma globular compactada, tamanho monodisperso e superfície funcional controlada, os dendrímeros são excelentes candidatos para transportadores de fármacos. Estes podem estar dentro da estrutura dendrítica (neste caso, as interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações hidrogênio devem ser consideradas) ou ligados covalentemente em uma superfície (envolvendo interações eletrostáticas e covalentes) para proporcionar um conjugado fármaco-dendrímero (LIU, FRÉCHET, 1999; EMANUELE, ATTWOOD, 2005).

Os dendrímeros podem ser utilizados para melhorar características como solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade quando os compostos estão encapsulados na estrutura dendrítica. Tais sistemas podem proporcionar a liberação controlada de fármacos (LEON, KAWA, FRÉCHET, 1996; EMANUELE, ATTWOOD, 2005). A natureza da encapsulação do fármaco com o dendrímero pode ser uma simples relação física ou envolver interações não-ligantes com a estrutura dendrítica. Muitos dos trabalhos nesta área estão baseados na suposição de que os dendrímeros

apresentam um núcleo oco e periferia densa (EMANUELE, ATTWOOD, ABU-RMAILEH, 2003) e, certamente, a encapsulação de fármacos está relacionada com esta hipótese. Entretanto, diversos estudos teóricos realizados desde 1990 mostraram que a estrutura dendrítica é composta por ligações flexíveis e deve exibir a densidade máxima no centro da molécula com diminuição na periferia (BAARS, MEIJER, 2000; BALLAUFF, LIKOS, 2004).

Os dendrímeros despertam interesse pelo tamanho nanomolar, por sua preparação e funcionalização além da facilidade de obtenção de cópias de grupos de superfície em processos de reconhecimento biológico. Recentes avanços com glicodendrímeros e peptidodendrímeros vêm sendo observados (CLONINGER, 2002).

Glicodendrímeros: possuem carboidratos na estrutura. Este tipo de dendrímero tem sido útil em diversas aplicações biológicas, por exemplo, estudos na interação carboidrato-proteína, fundamental para o reconhecimento intercelular. Além disso, 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 vem despertando interesse. Apresentam baixa polidispersividade, se comparados com os glicopolímeros. As gerações destes compostos são responsáveis pelo tamanho da estrutura dendrítica.

Peptidodendrímeros: apresentam peptídeos enxertados na superfície, onde as ramificações dos dendrímeros possuem aminoácidos a partir de um centro. Os peptidodendrímeros são mais solúveis em água, mais estáveis para proteólise e menos tóxicos que análogos poliméricos lineares em células humanas. 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). A atividade antimicrobiana de dendrímeros contendo lisina como centro com tetrapeptídeo e octapeptídeo como superfície têm sido avaliadas (TAM, LU, YANG, 2002), bem como a ação antiangiogênese de peptidodendrímeros com lisina como centro e arginina na superfície (KASAI *et al.*, 2002). Por outro lado, tetrâmeros e peptídeos imunogênicos

em dendrímeros de lisina são reconhecidos por *Plasmodium falciparum*, indicando possível aplicação destes para o desenvolvimento de vacina (CHAVES *et al.*, 2001).

Existem estudos que avaliam a utilização de dendrímeros de PAMAM funcionalizados com unidades periféricas de benzilpeniciloil (BPO). Este grupo peniciloil é o maior responsável pelas respostas alérgicas aos antibióticos beta-lactâmicos (WEISS, ADKINSON, 1988). Ligações covalentes de benzilpenicilinas aos dendrímeros produzem novos compostos com propriedades únicas de solubilidade, densidade eletrônica e especificidade. Além disso, esses compostos têm a habilidade de permanecer em soluções aquosas em processos analíticos (BLANCA *et al.*, 1999). O reconhecimento estrutural de dendrímero funcionalizado com grupo peniciloil pela IgE tem sido comparado com os clássicos conjugados de albumina sérica e poli-L-lisina. Dessa forma, estes compostos constituem-se em candidatos promissores para o desenvolvimento de novos testes *in vitro* para diagnóstico de alergias a antibióticos beta-lactâmicos.

McCARTHY e colaboradores (2005) investigaram as propriedades antivirais de dendrímeros derivados de polianiónicos. A dificuldade de obtenção de polímeros polianiónicos sintéticos puros é o maior obstáculo para se determinar o elemento estrutural responsável pela atividade biológica. Em contraste, dendrímeros polianiónicos são espécies moleculares únicas e os componentes responsáveis pela atividade podem estar relacionados com compostos específicos derivados de entidades moleculares definidas. Os grupos de superfície de dendrímeros aniônicos podem ser visualizados na figura 10.

FIGURA 10 – Grupos de superfície aniônica de dendrímeros (McCARTHY *et al.*, 2005).

1.2.1.1.3 Síntese dos dendrímeros

Desde 1979, duas estratégias de sínteses vêm sendo desenvolvidas para os dendrímeros (TOMALIA *et al.*, 1985). A primeira consiste no método divergente (Figura 11) em que o dendron cresce a partir de um centro (árvore molecular) (ESFAND, TOMALIA, 2001). 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). Durante os anos 1980, estruturas dendríticas foram construídas pelo método de árvore molecular. A abordagem divergente é atualmente preferida em rotas comerciais do mundo todo (ESFAND, TOMALIA, 2001).

O segundo método é conhecido como processo de crescimento convergente (Figura 11). Neste, a superfície molecular do dendrímero (isto é, as folhas das árvores) reagem com o foco central. Para a obtenção da estrutura dendrítica, vários dendrons reagem com o foco multifuncional (ESFAND, TOMALIA, 2001). Quando as moléculas crescentes são grandes o suficiente, várias delas são ligadas a um centro apropriado para formar o dendrímero (MATTHEWS, SHIPWAY, STODDART, 1998). Como vantagem para este tipo de síntese está a fácil purificação e a ocorrência de defeitos nas estruturas terminais é minimizada (HAWKER, FRÉCHET, 1990; KLAJNERT, BRYSEWSKA, 2001).

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

FIGURA 11 - Esquema de síntese divergente e convergente, respectivamente (BOAS, HEEGAARD, 2004).

1.3 MODELAGEM MOLECULAR

Durante os anos 1980, a modelagem molecular passou de pesquisa básica realizada em laboratórios de universidades para componente crítico para o desenvolvimento racional de novos agentes terapêuticos para doenças humanas, com aplicações amplas na Química Medicinal (HANSCH, SAMMES, TAYLOR, 1990; COHEN, 1996).

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, 2001). 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: modelagem direta e indireta. Na primeira, é conhecida a estrutura do receptor (por cristalografia de raios-X, RMN, por exemplo). Já a segunda, compreende a ausência de dados que possam elucidar 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 (2001), os métodos utilizados para calcular as propriedades das estruturas podem ser:

1. Mecânica molecular: as estruturas moleculares geradas em modelagem molecular devem passar por um procedimento prévio de otimização de geometria para que seja obtido um 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 (BARREIRO, RODRIGUES, 1997). 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: têm como parâmetros equações da física quântica, que consideram os elétrons e núcleos dos átomos. Isto permite a obtenção de resultados com maior precisão (BARREIRO, RODRIGUES, 1997; CARVALHO *et al.*, 2003). A mecânica quântica é subdividida em métodos *ab initio* e semi-empíricos. 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, 2001).

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

b) Métodos semi-empíricos: são úteis para moléculas que possuem de 10 a 120 átomos. Constituem 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, 2001; CARVALHO *et al.*, 2003).

As moléculas, em geral, não são rígidas. As conformações das moléculas podem variar no vácuo, em líquidos, soluções, 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. Um modo de cálculo desta propriedade é a abordagem da exploração sistemática de torção Monte Carlo realizada por análise estatística aleatória seguida por avaliação energética das conformações (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 uma 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).

Na realização do procedimento de análise conformacional, o emprego do método MMFF94 tem demonstrado bons ou mesmo melhores resultados dos que os calculados por métodos semi-empíricos, quando comparações são feitas a valores de energias experimentais. Métodos semi-empíricos devem ser restritos a sistemas moleculares muito pequenos, pois, caso contrário, o maior custo operacional ou a incapacidade de término do cálculo podem ocorrer (HEHRE, 2003). Para sistemas grandes como os dendrímeros aqui estudados a opção por emprego da análise conformacional por Monte Carlo usando o MMFF94 como método de cálculo parece ser indicada.

1.3.1 Parâmetros úteis para modelagem molecular

Mapa de potencial eletrostático (MEP, do inglês *Molecular Electrostatic Potential*): o cálculo do MEP é feito a partir de uma sonda (carga unitária positiva) que se dispõe em diferentes posições ao redor da molécula. A interação de energia em cada posição é medida e considerada como interação de carga parcial de cada átomo (PATRICK, 2001). Para a determinação deste parâmetro, é necessário um tratamento prévio das propriedades eletrônicas das moléculas ;

Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO): a energia do orbital molecular ocupado de maior energia é obtida por cálculos de orbital molecular e se relacionam com o potencial de ionização de uma molécula e sua reatividade como nucleófilo (SANT'ANNA, 2002).

2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

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.

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 *in vitro* em tripomastigotas e, especialmente, em amastigotas, em relação ao benznidazol e toxicidade diminuída em quatro vezes, comparativamente ao protótipo (GÜIDO *et al.*, 2001).

hidroximetilnitrofural

Com a meta de prosseguir com os estudos acerca do hidroximetilnitrofural, sintetizaram-se bases de Mannich com aminoácidos, mais estáveis que esse nitrofurano (TROSSINI, 2004). Outras formas de transporte poderiam ser, também, sintetizadas com o mesmo intuito.

Face ao exposto e tendo em vista o caráter promissor de dendrímeros, o objetivo deste trabalho foi estudar as condições reacionais para a síntese do pró-fármaco dendrimérico de primeira geração, de liberação controlada, com toxicidade diminuída e aumento de eficácia.

Tal estudo será fundamental para a síntese dos derivados de segunda a terceira gerações, a serem, posteriormente, sintetizados.

Os dendrímeros serão formados pelo inositol (foco central); ácido L(-)-málico (espaçante) e o derivado hidroximetilado do nitrofural (NFOH), através de etapas seguidas de esterificação.

O inositol ou *mioinositol* é um poliálcool cíclico contendo um anel de seis átomos de carbono e seis grupos OH (cicloexanopoliol). Trata-se de importante constituinte

celular, envolvido em diferentes processos bioquímicos. Em mamíferos, o inositol existe principalmente sob a forma de derivados fosforilados, os quais participam da comunicação celular (ALMEIDA *et al.*, 2003). É, portanto, substância que tem histórico de participação no organismo.

inositol

As estruturas do pró-fármaco dendrímero de primeira geração, bem como os de segunda e terceira gerações, os quais se pretende sintetizar, posteriormente, a este trabalho, encontram-se apresentadas a seguir:

Dendrímero com seis ramificações (Geração 1):

Dendrímero com 12 ramificações (Geração 2):

Dendrímero com 18 ramificações (Geração 3):

Espera-se que esses derivados, em razão de permitirem a ligação de 6 a 18 moléculas de hidroximetilnitrofural, aumentem a eficácia desse composto dendrimérico.

O mecanismo de liberação dos dendrímeros propostos poderá compreender: a hidrólise dos ésteres ligados diretamente ao mioinositol, com hidrólise posterior do hidroximetilnitrofural do transportador maleílico, ou a hidrólise inicial das ramificações mais externas, até que os pró-fármacos 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. 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.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagentes e solventes

- Acetato de etila (Merck)
- Acetonitrila grau cromatográfico (Merck)
- Ácido acético (Merck)
- Ácido clorídrico (QM)
- Ácido L(-)-málico (Sigma)
- Ácido *p*-toluenossulfônico monoidratado (Merck)
- Ácido sulfúrico (QM)
- Álcool etílico (Merck)
- Álcool metílico grau cromatográfico (Merck)
- Acetona (Merck)
- Bicarbonato de sódio (Synth)
- 1,1'-Carbonildiimidazol (DCI) (Acros Organic)
- Carbonato de potássio (Merck)
- Cloranfenicol (FURP)
- Cloreto de acetila (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Cloreto de zinco (Mallinckrodt)
- Cloroformato de etila (Merck)
- Clorofórmio deuterado (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)
- Clorofórmio (Merck)
- Clorotrimetilsilano (TMSCI) (Acros)
- Dibromopropano
- Dicicloexilcarbodiimida (DCC) (Merck)
- Dimetilformamida (DMF) (Merck)

- Dimetilsulfóxido (QM)
- Dimetilsulfóxido deuterado (Merck)
- Diclorometano (Merck)
- 2,2-Dimetoxipropano (Aldrich)
- 4-Dimetilaminopiridina (DMAP) (Aldrich)
- 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (Merck)
- Formaldeído p.a (Merck)
- Hexano (Merck)
- Inositol (Sigma)
- Nitrofural (NF) (Avocado)
- Paraformaldeído (Reagem)
- Piridina (Merck)
- *p*-Nitrofenol (Carlo Erba)
- *p*-Toluenossulfonato de piridínio (preparado segundo FURNISS *et al.*, 1989)
- Sulfato de sódio anidro (Merck)
- Tetracloreto de carbono (Synth)
- Tetraidrofurano (THF) (Merck)
- Trietilamina (Merck)
- Tolueno (Merck)

3.1.2 Equipamentos

- Agitadores magnéticos
- Agitador mecânico
- Aparelho capilar Büchi para determinação de ponto de fusão
- Câmara de fotoestabilidade Farma 424 CF Nova Ética
- Espectrofotômetro FTIR Bomem®
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear 300 MHz BRUKER®, modelo Advanced DPX-300.
- HPLC Shimadzu® semipreparativo

- Liofilizador Christ Alfa 1-2
- Rotaevaporador Büchi

3.1.3 Software para modelagem molecular

- Spartan'O₄ para Linux versão 119 (Wavefunction Inc.)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Modelagem Molecular (MM)

O estudo de modelagem molecular foi realizado em microcomputador utilizando-se o programa Spartan'O₄ para Linux versão 119 (Wavefunction Inc.). Para a avaliação do método de síntese mais adequado a ser realizado, consideraram-se as estruturas do NFOH, inositol, ácido L(-)-málico e ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético (ácido málico protegido). A partir destes foram construídos os intermediários e respectivos dendrímeros de primeira geração, classificados, a seguir, de acordo com o método de síntese convergente ou divergente:

- **Síntese convergente:**

ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético e hidroximetilnitrofural,
ácido L(-)-málico e hidroximetilnitrofural,
dendrímero de primeira geração.

- **Síntese divergente:**

ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético e inositol,
ácido L(-)-málico e inositol,
dendrímero de primeira geração.

A estrutura de primeira geração do dendrímero de PAMAM (poliamidoamina) foi construída para a execução de análise comparativa.

A metodologia utilizada na modelagem molecular pode ser visualizada na figura 12.

As moléculas passaram por um processo de minimização de energia. Destaca-se que as moléculas de menor massa molecular como NFOH, inositol, ácido málico e seu derivado tiveram a estrutura otimizada na segunda vez por método semi-empírico AM1 (DEWAR, ZOEBISCH, STEWART, 1985). A seguir, a série de compostos passou por processo de análise conformacional por Monte Carlo, simulando o meio gasoso (vácuo) e solvatado (aquoso) por emprego do método AM1. O confômero de menor energia mínima (estado gasoso) foi selecionado e analisado. Os confômeros selecionados das moléculas menores foram empregados para a construção dos produtos subseqüentes,

intermediários, e a partir destes, os dendriméricos. Em razão do elevado número de átomos destas novas estruturas, tanto as etapas de otimização da geometria quanto a análise conformacional passaram a ser efetuadas empregando-se método MMFF94 e no estado gasoso. A análise dos aspectos estéricos e eletrônicos dos confôrmeros de menor energia mínima dos compostos em estudo serviram para a decisão do método de síntese mais indicado à obtenção dos produtos sintéticos planejados. As constantes empregadas nos cálculos e superfícies são as de condições padrão do programa.

FIGURA 12 – Esquema da metodologia utilizada nos estudos de modelagem molecular.

3.2.2 Síntese

3.2.2.1 Obtenção do derivado hidroximetilnitrofural (NFOH)

3.2.2.1.1 Planejamento fatorial 3^2 da síntese do NFOH

Esquema I - Síntese do derivado hidroximetilnitrofural.

Estes experimentos foram realizados com a colaboração do Professor Dr. Roy Eduard Bruns do Instituto de Química-UNICAMP.

A síntese do derivado hidroximetilnitrofural (esquema 1) foi realizada em meio alcalino. Nitrofural (5×10^{-3} mol), K₂CO₃ (proporções mol/mol descritas na Tabela I) e água (10 mL) foram adicionados no meio reacional. Formaldeído (18 mL) foi colocado em 2 etapas, 9 mL no início da reação e 9 mL na metade do tempo total de síntese (apresentados na Tabela I). Manteve-se o sistema sob agitação, sob proteção da luz, por tempo determinado. O produto foi lavado com metanol e recristalizado com metanol/água (6:0,1, v/v).

Os dados foram tratados estatisticamente com o programa STATISTICS licenciado para o Prof. Dr. Roy Edwards Bruns, que possibilitou a análise de superfície resposta com um melhor ajuste ao modelo quadrático (Equação 1).

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad \text{(Equação 1)}$$

Tabela I – Condições da síntese fatorial do NFOH

Fatores	-1	0	+1
1 – Tempo de reação	3h	7h	11h
2 – Proporção NF:K ₂ CO ₃	1:1	1:1,5	1:2

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

Esquema II – Síntese do ácido málico protegido.

As condições reacionais para a obtenção do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético (ácido málico protegido) encontram-se à Tabela II.

Tabela II - Reações para obtenção do ácido málico protegido

Métodos	Reagentes	Proporção molar dos reagentes	Condições de reação
A (STERLING, SLOVIN, BARASCH, 1987)	✓ ácido L-(-)-málico ✓ piridina ✓ 2,2-dimetoxipropano	$7,46 \times 10^{-3}$ $6,33 \times 10^{-3}$ 44×10^{-3}	-Tempo: 96 h -Agitação -Temperatura ambiente
B	✓ ácido L-(-)-málico ✓ piridina ✓ 2,2-dimetoxipropano	$7,46 \times 10^{-3}$ 13×10^{-3} 44×10^{-3}	-Tempo: 24 h -Refluxo
C	✓ ácido L-(-)-málico ✓ piridina ✓ 2,2-dimetoxipropano	$7,46 \times 10^{-3}$ 13×10^{-3} 44×10^{-3}	-Tempo: 2 h -Refluxo -CC/acetato de etila*
D	✓ ácido L-(-)-málico ✓ piridina ✓ 2,2-dimetoxipropano	$7,46 \times 10^{-3}$ 25×10^{-3} 44×10^{-3}	-Tempo: 2 h -Refluxo -CC/HCCl ₃ /MeOH 2:1(v/v)*
E	✓ ácido L-(-)-málico ✓ piridina ✓ 2,2-dimetoxipropano	$7,46 \times 10^{-3}$ 25×10^{-3} 44×10^{-3}	-Tempo: 2 h -Refluxo -CC/acetato de etila*
F (adaptado de STERLING, SLOVIN, BARASCH, 1987)	✓ ácido L-(-)-málico ✓ piridina ✓ 2,2-dimetoxipropano	$3,73 \times 10^{-3}$ $6,33 \times 10^{-3}$ 22×10^{-3}	-Tempo: 72 h -Agitação -Temperatura Ambiente - Rotaevaporação -Recristalização de hexano/diclorometano (1:1, v/v).

* CC/solvente – Cromatografia em coluna/eluente

Tabela II – Reações para obtenção do ácido málico protegido (cont.)

Experimento	Reagentes	Proporção molar dos reagentes	Condições de reação
G (STERLING, SLOVIN, BARASCH, 1987)	✓ ácido L-(-)-málico ✓ <i>p</i> -toluenossulfonato de piridínio (FURNISS <i>et al.</i> , 1989) ✓ 2,2-dimetoxipropano	$7,46 \times 10^{-3}$ $6,37 \times 10^{-4}$ 44×10^{-3}	-Tempo: 144 h -Agitação -Temperatura ambiente
H (GREEN, KIDDLE, THOMPSON, 1995)	✓ ácido L-(-)-málico ✓ ácido <i>p</i> -toluenossulfônico ✓ 2,2-dimetoxipropano	$7,5 \times 10^{-3}$ $1,58 \times 10^{-4}$ $20,33 \times 10^{-3}$	-Tempo: 30 min- Agitação - Temperatura Ambiente - Rotaevaporação a 50 °C
I (adaptado de GREEN, KIDDLE, THOMPSON, 1995)	✓ ácido L-(-)-málico ✓ ácido <i>p</i> -toluenossulfônico ✓ 2,2-dimetoxipropano	$7,5 \times 10^{-3}$ $1,58 \times 10^{-4}$ $20,33 \times 10^{-3}$	-Tempo: 3 h - Agitação - Temperatura Ambiente - Rotaevaporação a 50 °C
J (adaptado de GREEN, KIDDLE, THOMPSON, 1995)	✓ ácido L-(-)-málico ✓ ácido <i>p</i> -toluenossulfônico ✓ 2,2-dimetoxipropano	$7,5 \times 10^{-3}$ $1,58 \times 10^{-4}$ $20,33 \times 10^{-3}$	-Tempo: 7 h - Agitação -Temperatura Ambiente - Rotaevaporação a 50 °C
L (adaptado de GREEN, KIDDLE, THOMPSON, 1995)	✓ ácido L-(-)-málico ✓ ácido <i>p</i> -toluenossulfônico ✓ 2,2-dimetoxipropano	$7,5 \times 10^{-3}$ $1,58 \times 10^{-4}$ $20,33 \times 10^{-3}$	-Tempo: 24 horas -Agitação -Temperatura Ambiente - Rotaevaporação a 50 °C

Método A

Ácido L(-)-málico, piridina, 2,2-dimetoxipropano nas proporções molares indicadas, foram mantidos, sob agitação, à temperatura ambiente até que fosse obtida solução límpida (aproximadamente 96 h).

Método B, C, D, E

Ácido L(-)-málico, piridina, 2,2-dimetoxipropano, em proporções molares indicadas à Tabela II, foram mantidas em refluxo por tempo determinado. A solução foi evaporada sob pressão reduzida e o resíduo purificado por cromatografia em coluna de sílica, como descrito à Tabela II.

Método F

Ácido L(-)-málico, piridina, 2,2-dimetoxipropano, em proporções molares indicadas à Tabela II, foram mantidos à temperatura ambiente por aproximadamente 72 h, até que fosse obtida solução de coloração amarela. A solução foi evaporada sob pressão reduzida. O produto obtido foi recristalizado com a solução hexano/diclorometano (1:1, v/v). Houve a formação de duas fases distintas, uma solúvel e outra insolúvel, na mistura de solventes utilizada para a purificação.

Método G

Ácido L(-)-málico, *p*-toluenossulfonato de piridínio, 2,2-dimetoxipropano em proporções molares indicadas à Tabela II, foram mantidos à temperatura ambiente por 144 h.

Para a preparação de *p*-toluenossulfonato de piridínio (FURNISS *et al.*, 1989), adicionaram-se 15×10^{-3} mol de ácido *p*-toluenossulfônico monoidratado a 75×10^{-3} mol de piridina. A mistura foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 20 minutos.

O produto obtido (cristais brancos) foi rotaevaporado a 60 °C e recristalizado com acetona. Rendimento: 31%.

Método H, I, J, L

Foram mantidos sob agitação e à temperatura ambiente ácido L(-)-málico, ácido *p*-toluenossulfônico e 2,2-dimetoxipropano nas proporções molares indicadas na Tabela II. Após tempos de 30 minutos, 3, 7 e 24 horas, respectivamente, separaram-se 2 fases com água e diclorometano. Extraíu-se mais duas vezes a fase aquosa com diclorometano. As fases orgânicas foram reunidas e secas sob sulfato de sódio anidro. A solução obtida foi rotaevaporada a 50 °C e recristalizada de clorofórmio/tetracloreto de carbono 1:1 (v/v).

3.2.2.3 Síntese do intermediário de hidroximetilnitrofural e ácido málico protegido (DAMEN *et al.*, 2000).

Esquema III – Obtenção do intermediário hidroximetilnitrofural e ácido málico protegido.

Em banho de gelo e sob proteção da luz, foram mantidos sob agitação ácido málico protegido ($1,1 \times 10^{-3}$ mol) e DCC ($1,1 \times 10^{-3}$ mol) em solução de DMF (25 mL). Após 30 minutos, adicionaram-se derivado de hidroximetilnitrofural (1×10^{-3} mol) e DMAP ($1,2 \times 10^{-4}$ mol). A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente durante 9 dias. A reação foi acompanhada com cromatografia em camada delgada (CCD) (clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:5:5, v/v/v).

3.2.2.4 Síntese do intermediário inositol e ácido málico protegido (adaptado de DAMEN *et al.*, 2000)

Esquema IV – Obtenção do intermediário inositol e ácido málico protegido.

As condições reacionais para a obtenção intermediário inositol e ácido málico protegido podem ser observadas à Tabela III.

Tabela III – Reações para obtenção do intermediário inositol e ácido málico protegido

Método	Reagentes	Proporção molar	Solvente/ volume (mL)	Condições de reação
A	✓ ácido málico protegido	$6,6 \times 10^{-3}$	DMF	-Tempo: 7 horas
	✓ DCC	$6,6 \times 10^{-3}$	30 mL	-Agitação
	✓ inositol	1×10^{-3}		magnética
	✓ DMAP	$7,2 \times 10^{-4}$		-T. A*
B	✓ ácido málico protegido	$6,6 \times 10^{-3}$	DMF	-Tempo: 3 horas
	✓ EDC	$6,6 \times 10^{-3}$	30 mL	-Agitação
	✓ inositol	1×10^{-3}		magnética
	✓ DMAP	$6,6 \times 10^{-4}$		-T. A*
C	✓ ácido málico protegido	$1,5 \times 10^{-3}$	THF	-Tempo: 8 horas
	✓ DCC	$1,5 \times 10^{-3}$	50 mL	-Agitação
	✓ inositol	$1,92 \times 10^{-4}$		mecânica
	✓ DMAP	$1,5 \times 10^{-4}$		- Temperatura: -8 °C
D	✓ ácido málico protegido	$1,5 \times 10^{-3}$	THF	-Tempo: 8 horas
	✓ EDC	$1,5 \times 10^{-3}$	50 mL	-Agitação
	✓ inositol	$1,92 \times 10^{-4}$		mecânica
	✓ DMAP	$1,5 \times 10^{-4}$		-T. A*
E	✓ ácido málico protegido	$1,5 \times 10^{-3}$	THF	-Tempo: 8 horas
	✓ DCC	$1,5 \times 10^{-3}$	50 mL	-Agitação
	✓ inositol	$1,92 \times 10^{-4}$		mecânica
	✓ DMAP	$1,5 \times 10^{-4}$		-T. A*
F	✓ ácido málico protegido	$5,75 \times 10^{-3}$	THF	-Tempo: 8 horas
	✓ DCC	$5,75 \times 10^{-3}$	100 mL	-Agitação
	✓ inositol	$9,58 \times 10^{-4}$		mecânica
	✓ DMAP	$5,75 \times 10^{-4}$		-T. A*

* T. A = Temperatura ambiente

Método A

Em banho de gelo, foram mantidos sob agitação ácido málico protegido e DCC em de DMF. Após 30 minutos, adicionaram-se inositol e DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente até que fosse observada a formação de um produto por CCD (clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:5:5, v/v/v), ou seja, 7 h.

Método B

Em banho de gelo, foram mantidos sob agitação ácido málico protegido e EDC em DMF. Após 30 minutos, adicionaram-se inositol e DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente até que fosse observada a formação de um produto por CCD (metanol/clorofórmio 2:1, v/v), ou seja, 3 h. A solução foi filtrada sob pressão reduzida. Em seguida, foi realizada a extração com água e diclorometano. As porções aquosas foram unidas e liofilizadas. O solvente da fração orgânica foi retirado em rotaevaporador, a 50 °C, e o produto apresentou aspecto oleoso e com coloração marrom. Novas extrações da porção orgânica com água foram realizadas com o intuito de se retirar o provável EDU (1-(3-diaminopropil)uréia) (produto secundário) observado nos resultados obtidos na análise no IV.

Método C

Em um béquer, preparou-se solução de ácido málico protegido e DCC em THF. O sistema foi mantido sob agitação mecânica, a 1100 rpm, por 10 min, a -10 °C. Em seguida, adicionaram-se inositol e DMAP. A reação foi mantida sob agitação por 8 horas, à temperatura controlada de -8 °C. Após esse período, filtrou-se o conteúdo reacional. O precipitado foi reservado e posteriormente analisado no IV. O filtrado foi transferido para funil de separação e adicionados 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 mantida sob sulfato de sódio anidro por 60 horas. Posteriormente, o solvente foi

retirado por rotaevaporação, a 50 °C, e o sólido esbranquiçado obtido foi analisado no IV.

As soluções aquosas resultantes das lavagens do produto foram colocadas em rotaevaporador para retirada completa de solvente orgânico. Subseqüentemente, foram colocadas em liofilizador.

Método D, E, F

Em banho de gelo, foram mantidos sob agitação e em THF, ácido málico protegido e agente condensante (DCC ou EDC) em proporções molares descritas à Tabela III. Após 30 minutos, adicionaram-se inositol e DMAP em proporções indicadas à Tabela III. A mistura reacional foi mantida sob agitação e à temperatura ambiente. Filtrou-se o conteúdo reacional. O precipitado foi reservado e posteriormente analisado no IV. O filtrado foi transferido para funil de separação e adicionados 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 mantida sob sulfato de sódio anidro por 60 horas. Posteriormente, o solvente foi retirado por rotaevaporação, a 50 °C, e o sólido esbranquiçado obtido foi analisado no IV.

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

3.2.2.5 Síntese do intermediário inositol e ácido L(-)-málico (DAMEN *et al.*, 2000)

Esquema V – Etapa final de obtenção do intermediário inositol e ácido L(-) málico.

Dissolveram-se o sólido obtido por meio do método F em uma solução de ácido acético, THF e água (1:1:1, v/v/v). A mistura reacional foi mantida sob agitação, à

temperatura ambiente por 7 horas. Posteriormente, os solventes foram retirados sob pressão reduzida, a 50 °C. O produto obtido foi analisado por IV e RMN ^1H .

3.2.2.6 Síntese do dendrímero de primeira geração

As condições reacionais para a obtenção do dendrímero de primeira geração podem ser encontradas à Tabela IV.

Tabela IV – Reações para obtenção do dendrímero de primeira geração

Método	Reagentes	Proporção molar	Solvente/volume (mL)	Condições de reação
A	✓ intermediário inositol e ácido L(-)- málico	$1,14 \times 10^{-4}$	THF 50 mL	-Tempo: 12 horas -Agitação magnética
	✓ DCC	$1,14 \times 10^{-4}$		-T. A*
	✓ NFOH	$3,42 \times 10^{-4}$		
	✓ DMAP	$1,14 \times 10^{-5}$		
B	✓ intermediário inositol e ácido L(-)- málico	$5,71 \times 10^{-5}$	THF 50 mL	-Tempo: 12 horas -Agitação magnética
	✓ NFOH	$5,71 \times 10^{-5}$		-T. A*
	✓ EDC	$1,713 \times 10^{-4}$		
	✓ DMAP	$5,71 \times 10^{-6}$		
C (STAAB, MANNSCHRECK, 1962)	✓ intermediário inositol e ácido L(-)- málico	$5,71 \times 10^{-5}$	THF 50 mL	-Tempo: 12 horas -Agitação magnética
	✓ NFOH	$5,71 \times 10^{-5}$		-T. A*
	✓ DCI	$1,713 \times 10^{-4}$		

*T.A = Temperatura ambiente

Esquema VI – Obtenção do dendrímero de primeira geração, síntese divergente.

Método geral de síntese

Em banho de gelo e com proteção de luz, preparou-se solução de intermediário formado pelo inositol e ácido L-(-)-málico e agente condensante (DCC, EDC ou DCI) em proporções molares descritas na Tabela IV, em THF (50 mL). O sistema foi mantido sob agitação mecânica, a 1000 rpm, por 30 min. Em seguida, adicionaram-se NFOH e DMAP (mol/mol). A reação foi mantida sob agitação por 12 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, filtrou-se o conteúdo reacional. O filtrado foi transferido para funil de separação e adicionados 30 mL de acetato de etila. A extração foi realizada em etapas, com 30 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 30 mL de água e 30 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi mantida sob sulfato de sódio anidro por 24 horas. Posteriormente, o solvente foi retirado por rotaevaporação, a 50 °C, e o produto obtido foi analisado por RMN ¹H.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético (85:10:5, v/v/v).

No método C não se utilizou DMAP e as proporções dos reagentes obedeceram ao que foi descrito por Staab e Mannschreck (1962).

As condições reacionais para a obtenção do dendrímero de primeira geração podem ser encontradas à Tabela IV.

3.2.2.7 Esterificação do hidroximetilnitrofural

3.2.2.7.1 A partir do hidroximetilnitrofural

As condições reacionais para a tentativa de esterificação do derivado hidroximetilnitrofural encontram-se à Tabela V.

Tabela V – Reações de esterificação do hidroximetilnitrofural

Método	Reagentes	Proporção molar	Solvente/ volume (mL)	Condições de reação
A	✓ cloreto de acetila	$4,39 \times 10^{-4}$	piridina	-Tempo: 12 h
	✓ NFOH	$4,39 \times 10^{-4}$	20 mL	-Agitação magnética -T. A*
B	✓ cloreto de acetila	$2,35 \times 10^{-4}$	THF	-Tempo: 4 h
	✓ NFOH	$2,35 \times 10^{-4}$	20 mL	-Agitação magnética -T. A*
	✓ 3 gotas H ₂ SO ₄ conc.			
C	✓ cloreto de acetila	1×10^{-3}	THF	-Tempo: 12 h
	✓ NFOH	1×10^{-3}	50 mL	- Agitação magnética -T. A*
	✓ 1 gota H ₂ SO ₄ conc.			
D	✓ anidrido succínico	1×10^{-3}	THF	-Tempo: 12 h
	✓ NFOH	1×10^{-3}	10 mL	-Agitação magnética -T. A*
	✓ 1 gota H ₂ SO ₄ 20 %			
E	✓ anidrido succínico	1×10^{-3}	THF	-Tempo: 3 h
	✓ NFOH	2×10^{-3}	20 mL	-Agitação magnética -Temperatura: 50 °C
	✓ 3 gotas H ₂ SO ₄ conc.			
F	✓ ácido málico protegido	1×10^{-3}	THF	-Tempo: 48 h
	✓ NFOH	2×10^{-3}	20 mL	-Agitação magnética --T. A*
	✓ 6 gotas de H ₂ SO ₄ 20 %			
	✓ inositol	$3,33 \times 10^{-5}$	THF 20 mL	-Tempo: 3 dias -Agitação magnética, T.A*

* T.A = Temperatura ambiente

Esquema VII – Esterificação do NFOH pelos métodos A, B, C.

Esquema VIII – Esterificação do NFOH pelos métodos D, E.

Esquema IX – Esterificação do NFOH pelo método F.

Método A

Cloreto de acetila e NFOH foram adicionados em piridina. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 12 horas, à temperatura ambiente e com proteção da luz. Após esse período, filtrou-se o conteúdo reacional. O filtrado foi transferido para funil de separação e foram adicionados 40 mL de acetato de etila. A extração foi realizada com 20 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 20 mL de água e 20 mL de

solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi mantida em sulfato de sódio anidro por 24 horas. Posteriormente, o solvente orgânico foi rotaevaporado, a 40 °C.

A reação foi acompanhada com CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético (85:10:5, v/v/v).

Métodos B, C, D, E,

Proporções molares de cloreto de acetila ou anidrido succínico, conforme descrito à Tabela V, e NFOH foram dissolvidas em THF. Além desses reagentes, adicionaram-se gotas de ácido sulfúrico (concentrado ou a 20%) no meio reacional. O sistema foi mantido sob agitação, com proteção da luz, com temperatura e tempo indicados na Tabela V. Em seguida, o solvente foi rotaevaporado à pressão reduzida, a 40 °C.

A reação foi acompanhada por CCD (fase móvel: clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:10:5, v/v/v).

Método F

Para o método F, após reação de 48 horas com o ácido málico protegido, houve a formação de um precipitado, que foi filtrado sob pressão reduzida. Na porção solúvel, adicionaram-se 40 mL de água. Em seguida, a extração foi feita 3 vezes com 30 mL de acetato de etila. Posteriormente, o produto permaneceu em sulfato de sódio anidro por 24 horas e o solvente foi retirado por rotaevaporação, a 50 °C. A etapa seguinte foi adição direta, sem isolamento do produto, de inositol, estimando rendimento de 20% na síntese do éster intermediário ácido málico protegido e NFOH. O sistema foi mantido sob agitação, à temperatura ambiente e sob proteção da luz, por 3 dias. CCD (fase móvel: clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:10:5, v/v/v) foi utilizada para acompanhar a reação.

3.2.2.7.2 A partir de um anidrido misto (adaptado de BODANSZKY, BODANSZKY, 1984).

Esquema X – Síntese do intermediário anidrido misto do ácido L(-)-málico e NFOH.

Ácido málico (2×10^{-3} mol) foi adicionado em THF (25 mL). A solução foi mantida em agitação, com proteção da luz. Em seguida, adicionou-se a trietilamina (140 μL). O sistema foi resfriado a -5°C . A etapa posterior foi adição de cloroformato de etila ($1,01 \times 10^{-3}$ mol), em pequenas porções. Após 20 minutos, adicionou-se solução de NFOH ($1,05 \times 10^{-3}$ mol) e trietilamina (146 μL) em 25 mL de THF. Quando todo material foi dissolvido, a reação foi aquecida a 50°C por 20 horas e 30 minutos.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:10:5, v/v/v.

3.2.2.7.3 Esterificação de NFOH com éster do ácido málico protegido com *p*-nitrofenol

✓ Esterificação do ácido málico protegido com *p*-nitrofenol

Esquema XI – Síntese do intermediário ácido málico protegido e *p*-nitrofenol.

Preparou-se solução de ácido málico protegido ($8,85 \times 10^{-3}$ mol) e DCC ($8,85 \times 10^{-3}$ mol) em THF (50 mL). O sistema foi mantido sob agitação e com proteção da luz, em banho de gelo, por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se *p*-nitrofenol ($8,85 \times 10^{-3}$ mol) e DMAP ($8,85 \times 10^{-4}$ mol) e a reação foi mantida à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, filtrou-se o conteúdo reacional. O filtrado foi transferido para funil de separação. Adicionaram-se acetato de etila (40 mL) e realizou-se a extração com 30 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, água e solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi mantida sob sulfato de sódio anidro por 24 horas. O solvente foi retirado por rotaevaporação, a 50 °C.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:10:5, v/v/v.

✓ Esterificação do NFOH

Esquema XII – Síntese do intermediário ácido málico protegido e *p*-nitrofenol e NFOH.

Dissolveu-se o éster do ácido málico protegido com o *p*-nitrofenol ($2,28 \times 10^{-3}$ mol) e adicionou-se NFOH ($1,14 \times 10^{-3}$ mol) em THF (35 mL). Adicionaram-se 3 gotas de H₂SO₄ concentrado. A reação foi mantida sob agitação a 50 °C por 6 horas, com proteção da luz. Após esse período, filtrou-se o conteúdo reacional. O filtrado foi extraído 3 vezes com acetato de etila (30 mL). A fase orgânica foi mantida em sulfato de sódio anidro por 24 horas. O solvente foi rotaevaporado, a 50 °C.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:10:5, v/v/v.

3.2.2.7.4 A partir do clorometilnitrofural

✓ Halogenação do NFOH

Esquema XIII – Halogenação do NFOH.

Reagem-se NFOH (1×10^{-3} mol), cloreto de zinco (1×10^{-3} mol) e HCl (1×10^{-3} mol) em THF (50 mL). O sistema foi mantido sob agitação, a temperatura ambiente, com proteção à luz, por 3h30min. Após esse período, a solução foi transferida para funil de separação e foram adicionados 40 mL de água. A extração foi realizada 3 vezes com 30 mL de acetato de etila. A porção orgânica foi mantida em sulfato de sódio anidro por 24 horas. O solvente foi retirado sob pressão reduzida, a temperatura de 50 °C.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:10:5, v/v/v.

3.2.2.7.5 A partir do nitrofural

✓ Halogenação e alquilação do NF

As condições reacionais para alquilação e halogenação do NF podem ser observadas à Tabela VI.

Tabela VI – Reações de alquilação e halogenação do NF

Método	Reagentes	Proporção molar	Solvente/volume (mL)	Condições de reação
A (TROSSINI, 2004)	✓ NF	2×10^{-3}	THF	-Tempo: 6 dias
	✓ BrCH ₂ Br	1×10^{-3}	50 mL	-Agitação magnética
	✓ K ₂ CO ₃	1×10^{-3}		-T. A*
B	✓ NF	2×10^{-3}	THF	-Tempo: 50 h
	✓ BrCH ₂ Br	1×10^{-3}	50 mL	-Agitação magnética
	✓ K ₂ CO ₃	1×10^{-3}		-T. A*
	✓ piridina	1×10^{-4}		
C (TOURINHO, ROCHA, 1967)	✓ NF	2×10^{-3}	THF	-Tempo: 6 dias
	✓ formaldeído	2×10^{-3}	30 mL	-Agitação magnética
	✓ HCl	$3,3 \times 10^{-3}$		-T. A*
	✓ piridina	$3,3 \times 10^{-4}$		
D (MOREIRA <i>et al.</i> , 1994)	✓ NF	2×10^{-3}	THF	-Tempo: 6 dias
	✓ paraformaldeído	0,15 g	40 mL	-Agitação magnética
	✓ clorotrimetilsilano	10 mL		-Temperatura: 50 °C
E	✓ NF	2×10^{-3}	Formaldeído	-Tempo: 2 dias
	✓ K ₂ CO ₃	3×10^{-3}	18 mL	-Agitação magnética
	✓ água	10 mL		-T. A*
	✓ formadeído	18 mL		
	✓ clorotrimetilsilano	10 mL		

*T.A = Temperatura ambiente

Esquema XIV – Halogenação e alquilação NF.

Métodos A e B

A reação foi realizada utilizando NF e BrCH_2Br , em meio básico de K_2CO_3 , na presença de piridina. Em sistema com proteção à luz, adicionaram-se o BrCH_2Br em solução de THF, juntando-se gota a gota, solução de NF e K_2CO_3 e piridina (para o método B). A reação foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por tempo descrito na Tabela VII. Em seguida, realizou-se a extração após a adição de 50 mL de água em funil de separação. O procedimento foi realizado 2 vezes com 50 mL de acetato de etila. O extrato orgânico foi lavado com água (50 mL) e secado sob sulfato de sódio anidro por 24 horas. O solvente foi retirado em rotaevaporador, a 50 °C.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:10:5, v/v/v.

Método C

Reagem-se NF, formaldeído, HCl e piridina, em THF. Aos poucos, foram adicionadas 3 gotas de H_2SO_4 concentrado. A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente, com proteção da luz e sob agitação, durante 6 dias.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:10:5, v/v/v.

Método D

Reagem-se NF, paraformaldeído e clorotrimetilsilano em THF. A mistura reacional foi mantida à temperatura de 50 °C, com proteção da luz, sob agitação e em atmosfera inerte, durante 3 dias.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:10:5, v/v/v.

Método E

Utilizou-se NF em meio básico de carbonato de potássio, na proporção de 1:1 (mol/mol). Clorotrimetilsilano e excesso de formaldeído em meio aquoso foram adicionados em duas etapas: metade da concentração no início da reação e outra metade 7 horas após o início da síntese. O sistema permaneceu sob agitação, a temperatura ambiente por 3 dias.

A reação foi acompanhada por CCD (clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:10:5, v/v/v).

3.2.2.8 Síntese do dendrímero formado pelo inositol, ácido málico e cloranfenicol (*Patente*)

3.2.2.8.1 Síntese do intermediário ácido málico protegido e cloranfenicol (adaptado de DAMEN *et al.*, 2000)

Preparou-se uma solução de ácido L(-)-málico protegido ($3,484 \times 10^{-3}$ mol) e DCC ($3,484 \times 10^{-3}$ mol) em THF (50 mL). O sistema foi mantido sob agitação magnética por 30 min, em banho de gelo. Em seguida, adicionaram-se cloranfenicol ($3,484 \times 10^{-3}$ mol) e DMAP ($3,484 \times 10^{-4}$ mol). A reação foi mantida sob agitação por 10 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, filtrou-se o conteúdo reacional. O filtrado foi transferido para funil de separação e adicionaram-se 40 mL de acetato de etila. A extração foi realizada em etapas, com 30 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 30 mL de água e 30 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi mantida sob sulfato de sódio anidro por 24 horas. Posteriormente, o solvente foi retirado por rotaevaporação, a 50 °C, e o produto obtido foi analisado no IV.

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

Esquema XV - Síntese do intermediário cloranfenicol e ácido málico protegido.

3.2.2.8.2 Desproteção do intermediário cloranfenicol e ácido málico protegido (DAMEN et al., 2000)

Dissolveu-se o sólido obtido em 3.2.2.15.2 em solução de ácido acético, tetraidrofurano e água (1:1:1, v/v/v). A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente por 8 horas. Posteriormente, os solventes foram retirados sob pressão reduzida. O produto obtido foi analisado por IV.

Esquema XVI - Síntese do intermediário cloranfenicol e ácido L(-)-málico.

3.2.2.8.3 Obtenção do dendrímero de primeira geração

Esquema XVII- Obtenção do dendrímero de primeira geração.

Preparou-se uma solução do sólido obtido em 3.2.2.8.2 ($1,825 \times 10^{-3}$ mol) e DCC ($1,825 \times 10^{-3}$ mol) em THF (50 mL). O sistema foi mantido sob agitação mecânica, a 1000 rpm, por 30 min, em banho de gelo. Em seguida, adicionaram-se inositol ($3,65 \times 10^{-3}$ mol) e DMAP ($1,825 \times 10^{-4}$ mol). A reação foi mantida sob agitação por 13 horas, à temperatura ambiente. Após esse período, filtrou-se o conteúdo reacional. O filtrado foi transferido para funil de separação e adicionaram-se 40 mL de acetato de etila. A extração foi realizada em etapas, com 30 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 30 mL de água e 30 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi mantida sob sulfato de sódio anidro por 24 horas. Posteriormente, o solvente foi retirado por rotaevaporação, à temperatura de 50 °C. O produto obtido foi analisado no IV.

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

3.2.3 Análise

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

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

3.2.3.2 Cromatografia

3.2.3.2.1 *Em camada delgada (CCD)*

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

3.2.3.2.2 *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

As análises foram efetuadas em equipamento para CLAE, semi-preparativo, marca Shimadzu, na FCF-USP, utilizando-se colunas e eluentes adequados.

Cerca de 3 mg de ácido málico, ácido málico protegido, provável DCU e o possível produto intermediário inositol e ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético foram solubilizados em 1 mL de metanol. A fase móvel utilizada neste procedimento foi acetonitrila/água/metanol (5:4:1, v/v/v). 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 Ensaios de fotoestabilidade do NF e NFOH

Estes estudos foram realizados com a colaboração do Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz do Departamento de Farmácia 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).

Foram analisadas a fotoestabilidade do NF e NFOH em solução água/etanol (1:1, v/v), em concentração de 10 µg/mL. Adicionaram-se 10 mL de solução em frasco-ampola de vidro transparente, fechados hermeticamente. Uma das ampolas foi considerada controle. Os frascos foram protegidos com papel alumínio e colocados na câmara de fotoestabilidade por tempos determinados, de 0-60 min, a temperatura de 25 °C ± 0,5 °C. O tempo de exposição foi controlado pela retirada do papel alumínio de uma das amostras a cada tempo indicado. Manteve-se o controle protegido da luz durante todo o teste.

Foram realizadas as varreduras no UV entre 190 nm e 400 nm para obter o máximo comprimento de onda detectável. As amostras obtidas após fotodegradação foram lidas nos comprimentos de onda de 386 nm para o NF e 382 nm para o NFOH. A quantificação do fármaco recuperado foi baseada na reta de calibração previamente construída e submetida a análise de regressão linear.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MODELAGEM MOLECULAR

A obtenção de dendrímeros pode ser realizada pelos métodos convergente, divergente e ortogonal. Neste trabalho, a Modelagem molecular foi utilizada com o objetivo de auxiliar na compreensão dos possíveis graus de dificuldade para execução das rotas sintéticas dos métodos convergente e divergente. Desta forma, foram desenhados e analisados sob os pontos de vista físico-químico e estrutural as moléculas dos produtos de partida, NFOH, inositol, ácido L(-)-málico e seu derivado protegido, os intermediários previstos para ambas as abordagens sintéticas, terminando com os dendrímeros de primeira geração. Além disso, foram comparados os dendrímeros de geração 1 formados pelo ácido L(-)-málico, inositol e NFOH (propostos neste trabalho, desenhados pelos 2 métodos) e a primeira geração do dendrímero PAMAM.

O desenho das estruturas 3D em programas de modelagem molecular dificilmente fornece a geometria ideal. Assim, otimização da geometria deve ser feita subsequente e foi realizada por emprego de método de mecânica molecular MMFF94 (HALGREN, 1996). O método semi-empírico AM1 é indicado para estudo conformacional de nitrocompostos (DEBNATH *et al.*, 1991) e forneceu estrutura com ângulos diedros e comprimentos de ligação compatíveis aos dados de cristalografia de raios-X do NFOH (DORIGUETTO *et al.*, 2005).

Devido à natureza dos compostos estudados e a extensão característica das nanopartículas, a dinâmica molecular costuma ser a metodologia empregada para avaliação dos dendrímeros (CARBONE *et al.*, 2006; BOSKO, TODD, SADUS, 2004). Neste estudo foi proposto o método de Monte Carlo por emprego de mecânica molecular (MMFF94) para realização da etapa de análise conformacional. O método estocástico de Monte Carlo foi escolhido por ser o mais indicado para moléculas flexíveis e com superfície complexa. A possibilidade de uso de variação da temperatura (a partir de 5.000 K) fornecida pelo programa Spartan® permitiria possível simulação de estudo por dinâmica molecular. Em adição, o uso do método MMFF94 de mecânica

molecular tem fornecido resultados confiáveis na análise conformacional de moléculas extensas como os polímeros (HEHRE, 2003). Os confômeros selecionados e aqui analisados são aqueles calculados por simulação em meio gasoso (vácuo, $\epsilon=1$), pois a complexidade estrutural da maioria dos produtos em estudo não permitiu o cálculo em meio aquoso. Contudo, registra-se a importância da consideração do efeito do solvente em conformações de moléculas contendo cargas ou dipolos, como as estudadas, quando interações eletrostáticas são melhores avaliadas (HÖLTJE, FOLKERS, 1997).

Primeiramente, devem-se ressaltar as conformações espaciais do inositol, ácido L(-)-málico, ácido málico protegido e NFOH. O confômero de menor energia do inositol (figura 13) apresentou conformação em cadeira do anel cicloexanol, conforme esperado considerando-se ser esta a conformação mais estável para anéis de seis membros (ELIEL *et al.*, 2001). Além disso, pode-se observar, pelo modelo CPK, a disponibilidade das hidroxilas necessárias para a ocorrência das reações propostas no trabalho. Em adição, dados sobre HOMO mostram uma diferença na reatividade destes grupos funcionais, provavelmente pela conformação adotada pelo anel.

FIGURA 13 - Confômero de energia mínima do **inositol**: (A) Modelo em tubo; (B) Modelo CPK; (C) Mapa de potencial eletrostático na faixa de -30 kcal/mol (vermelho intenso) a 60 kcal/mol (azul intenso) superposto sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³; (D) Mapa de distribuição orbitalar de HOMO calculado considerando densidade eletrônica de 0,032 eV. Átomos nas cores: C (cinza), O (vermelho) e H (branco).

Análises da disposição espacial do ácido L(-)-málico e seu derivado protegido (nos modelos de tudo e CPK) (figura 14) demonstram a possibilidade de obtenção dos compostos desejados em razão da disponibilidade dos grupos funcionais necessários para o acontecimento das reações. O mapa de potencial eletrostático (MEP) evidenciou a reatividade dos grupos ácido carboxílicos, passíveis, portanto, de sofrerem um ataque nucleofílico para a formação do éster desejado.

FIGURA 14 - Conformêros de energia mínima: (1) **ácido málico**; (2) **ácido málico protegido**. (A) Modelo em tubo; (B) Modelo CPK; (C) Mapa de potencial eletrostático na faixa de - 30 kcal/mol (vermelho intenso) a 60 kcal/mol (azul intenso) superposto sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³. Átomos nas cores: C (cinza), O (vermelho) e H (branco).

No nitrofural (figura 15), destaca-se o efeito ressonante da molécula. Na molécula de NFOH observa-se, pelos modelos de tubo e CPK (figura 16), os grupos em posição favorável para a formação de ligação hidrogênio intramolecular (confômero em vácuo). Esta interação intramolecular pode conduzir à estabilidade química deste composto, o que comprometeria a obtenção dos pró-fármacos planejados ou, no mínimo, a baixos rendimentos de reação. Em adição, verificou-se no MEP (figura 16) região de baixa densidade eletrônica (identificado pela coloração vermelha de menor intensidade e área) sobre o grupo hidroxila.

FIGURA 15 - Confômero de energia mínima do **NF**. (A) Modelo em tubo; (B) Modelo CPK; (C) Mapa de potencial eletrostático na faixa de - 30 kcal/mol (vermelho intenso) a 60 kcal/mol (azul intenso) superposto sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³. Átomos nas cores: C (cinza), N (azul), O (vermelho), H (branco).

FIGURA 16 - Conformero de energia mínima do **NFOH**. (A) Modelo em tubo; (B) Modelo CPK; (C) Mapa de potencial eletrostático na faixa de -30 kcal/mol (vermelho intenso) a 60 kcal/mol (azul intenso) superposto sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³. Átomos nas cores: C (cinza), N (azul), O (vermelho), H (branco).

O método convergente tem como produto de partida o ácido L(-)-málico com proteção da carboxila e hidroxila, ou seja, o ácido málico protegido (Esquema II-página 41). Este composto irá reagir com o NFOH para a formação de ramificações necessárias para a composição do dendrímero de primeira geração (Esquema VI-página 50). A análise do conformero de menor energia do produto ácido L(-)-málico e NFOH (figura 17) mostrou a formação de vários isoconformeros (diferença relativa inferior a 5 kcalmol⁻¹), em que se percebe a possibilidade de interações intramoleculares (conformero 1, de menor energia em vácuo) como também o composto em sua conformação estendida, caracterizado por ausência de interações, gerado em meio solvatado (conformero 2). A ocorrência de interações dipolo-dipolo e de ligações hidrogênio tende a comprometer a reatividade do grupo carboxílico. Estas observações são mais evidentes no modelo CPK. Análise dos respectivos MEP mostrou uma densidade eletrônica (representada pela coloração azul) sobre a região do grupo ácido carboxílico, em especial para o conformero 2, favorável para a formação do produto posterior, o éster com o inositol. A ligação hidrogênio tende a diminuir a disponibilidade e assim a reatividade da carbonila.

FIGURA 17 - Conformêros de energia mínima (1, em vácuo e 2, em sistema solvatado) do intermediário da síntese convergente formado pelo NFOH e ácido L(-)-málico. (A) Modelo em tubo; (B) Modelo CPK; (C) Mapa de potencial eletrostático na faixa de -30 kcal/mol (vermelho intenso) a 60 kcal/mol (azul intenso) sobre densidade eletrônica constante de 0,0032 e/ua³. Átomos nas cores: C (cinza), N (azul), O (vermelho), H (branco).

Para o dendrímero de primeira geração desenhado pelo método convergente, em que se destaca a manutenção da conformação mais estável (em cadeira) do inositol (figura 18), observou-se a ocorrência de ligações hidrogênio em número significativo. Estas interações intramoleculares foram identificadas entre partes das moléculas de NFOH nas ramificações. É importante ressaltar que estas interações atrativas foram observadas em comprimentos próximos aos dados cristalográficos deste composto, (DORIGUETTO *et al.*, 2005). Ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo também são observadas entre a hidroxila do ácido L-(-)-málico de uma ramificação e átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio presentes na extensão da mesma ramificação ou ramificação vizinha. A proximidade originada poderia dificultar a síntese do dendrímero de segunda geração e outras subseqüentes, por comprometimento das hidroxilas, necessárias para a introdução de nova ramificação, bem como por grande impedimento estérico observado entre as ramificações. Neste contexto, verificou-se apenas uma hidroxila livre no dendrímero originado por este método (figura 19). A figura 20 mostra a disposição espacial das moléculas de NFOH, que se arranjam em duas a três.

FIGURA 18 - Confômero de energia mínima do **dendrímero de primeira geração** resultante da aplicação do método convergente. Em destaque a manutenção da conformação em cadeira, mais estável, do inositol. Átomos nas cores: C (cinza), N (azul), O (vermelho) e H (branco).

FIGURA 19 - Confômero de energia mínima do **dendrímtero de primeira geração** resultante da aplicação do método convergente. Em destaque a hidroxila livre. Átomos nas cores: C (cinza), N (azul), O (vermelho) e H (branco).

FIGURA 20 - Confômero de energia mínima do **dendrímtero de primeira geração** resultante da aplicação do método convergente. Em destaque a disposição espacial das moléculas de NFOH. Átomos nas cores: C (cinza), N (azul), O (vermelho) e H (branco).

O método de síntese divergente inicia com reação de esterificação entre o inositol e ácido málico protegido (A-Figura 21). Este anel deverá ser cindido para continuação das reações, portanto a desproteção destes grupos funcionais é necessária. O confômero de menor energia do intermediário inositol e ácido L(-)-málico (B-figura 21) mostra a formação de ligações hidrogênio principalmente entre a hidroxila do ácido carboxílico e a carbonila da função éster das ramificações adjacentes. Salienta-se, ainda, que este confômero foi gerado em sistema gasoso. Entretanto, a Modelagem Molecular permitiu a visualização espacial deste segundo intermediário por esta rota, no qual o grupo carbonila está mais acessível e reativo para a ligação ao NFOH, gerando o dendrímero de primeira geração.

FIGURA 21 - Confômero de energia mínima dos intermediários: (A) **inositol e ácido málico protegido** (B) **inositol e ácido L(-)-málico**. Átomos nas cores: C (cinza), O (vermelho) e H (branco).

A figura 22 mostra a estrutura proposta para o dendrímero de primeira geração pelo método divergente. Pode-se observar, assim como no modo convergente, a manutenção da conformação em cadeira (mais estável) do inositol, mesmo substituído.

FIGURA 22 - Confôrmoro de energia mínima do **dendrímero de primeira geração** resultante da aplicação do método divergente. Destaque a: **(A)** manutenção da conformação em cadeira, mais estável, do inositol; **(B)** disposição espacial das moléculas de NFOH. Átomos nas cores: C (cinza), N (azul), O (vermelho) e H (branco).

Uma vantagem deste método é a disponibilidade de 4 hidroxilas livres no dendrímero (figura 23), ao passo que o método convergente apresentou apenas uma, característica importante para a construção da segunda geração. Tal disponibilidade se deve à disposição das ramificações, em especial, à parte relativa às moléculas de NFOH. Estas moléculas novamente se arranjaram obedecendo às distâncias observadas nos dados cristalográficos deste composto (DORIGUETTO *et al.*, 2005), entretanto na proporção duas a duas, originando estrutura de maior e melhor orientação espacial, favorável a ligações de novas ramificações (figura 22).

FIGURA 23 - Confômero de menor energia do **dendrômero de primeira geração** resultante da aplicação do método divergente. Em destaque as hidroxilas livres. Átomos nas cores: C (cinza), N (azul), O (vermelho) e H (branco).

A Modelagem Molecular permitiu a análise comparativa entre os confômeros de menor energia para as estruturas propostas para os dendrímeros de geração 1 pelos métodos divergente e convergente e dendrímero de PAMAM (figura 24). Pode-se verificar que no dendrímero de geração 1, desenhados por ambas as rotas, havia ligações hidrogênio. Porém, como salientado antes, o dendrímero proposto pelo método divergente tem estrutura mais favorável à ocorrência das ligações subsequentes. De forma análoga, o PAMAM apresentou ligações hidrogênio entre suas ramificações, porém disposição espacial que poderia favorecer a construção de gerações posteriores pela maior liberdade dos grupos funcionais na periferia.

FIGURA 24 - Confômero de menor energia do **dendrômero PAMAM** (primeira geração). Átomos nas cores: C (cinza), N (azul), O (vermelho) e H (branco).

Em adição, podem ser observadas as diferenças entre os valores da área de superfície e volume molecular dos intermediários e dendrímeros, provenientes dos métodos convergente, divergente e PAMAM (tabela VII). Aumento destes valores se dá com o acréscimo e ampliação das ramificações ligadas ao inositol. O PAMAM apresentou valores inferiores aos dendrímeros de primeira geração obtidos pelos métodos divergente e convergente, porém não apresenta fármaco ligado. Em relação às informações referentes à energia de formação (entalpia) destas moléculas, destaca-se menor valor para o dendrímero de PAMAM em relação aos de primeira geração propostos neste trabalho. Por outro lado, os intermediários da síntese convergente e divergente necessários para a construção dos dendrímeros mostraram energias menores, chegando a valores de -95,24 kcal/mol para o formado pelo inositol e 6 moléculas de ácido málico protegido.

Tabela VII - Análise comparativa dos intermediários de síntese divergente, dendrímeros de geração 1 e PAMAM

Composto	Energia gás (kcal/mol)	Energia aquoso (kcal/mol)	Centros quirais	Massa molecular	Área de superfície (Å ²)	Volume (Å ³)
1	-22,83	-42,9593	1	384,30	377,59	336,37
2	-17,89	-68,50	1	344,24	327,70	288,43
3	-30,15	NC*	6	2137,48	1944,19	2051,70
4	-95,24	-116,93	6	116,98	1089,12	1141,98
5	-82,87	-229,93	6	876,59	706,73	712,23
6	-9,38	NC*	6	2137,48	1921,13	2046,83
7	-42,23	NC*	0	1429,88	1643,79	1697,57

1. Intermediário ácido málico protegido e NFOH; 2. Intermediário ácido L(-)-málico e NFOH; 3. Dendrímero de primeira geração proposto pelo método de síntese convergente; 4. Intermediário inositol e 6 moléculas de ácido málico protegido; 5. Intermediário inositol e ácido L(-)-málico; 6. Dendrímero de primeira geração proposto pelo método de síntese divergente; 7. PAMAM (primeira geração).

*Não calculado

Por fim, considera-se importante salientar que, associada às características estruturais antes descritas, o emprego da rota sintética divergente oferece como vantagem, em relação à síntese convergente, a independência do NFOH na obtenção dos *dendrons*. Pode-se inclusive, em proporções estequiométricas, adicionar as moléculas de NFOH, ou de outro fármaco de interesse, na última etapa reacional. Portanto, este método preserva a molécula de NFOH, instável na presença de luz, temperatura e condições drásticas de pH.

4.2 PLANEJAMENTO FATORIAL 3^2 DA SÍNTESE DO NFOH

Devido ao caráter antichagásico promissor do NFOH, a determinação experimental da influência de uma ou mais variáveis sobre a otimização da síntese deste composto é de grande interesse, uma vez que pode conduzir ao aumento do rendimento. O planejamento experimental é instrumento valioso para avaliar o efeito conjunto de diversos fatores sobre uma determinada característica de interesse (NEVES, SCHVAETZMAN, 2002).

Planejamento fatorial 3^2 recebe este nome por variar 2 fatores x_1 e x_2 em três níveis, -1, 0, +1 (BARROS NETO, SCARMINIO, BRUNS, 2002). O objetivo deste planejamento (TROSSINI *et al.*, submetido, 2007) foi otimizar a reação de hidroximetilação do NF e verificar a influência dos fatores tempo de reação (x_1) e proporção NF/K₂CO₃, mol/mol (x_2) no resultado da síntese. A escolha destes parâmetros baseou-se em experimentos prévios desenvolvidos no LAPEN-USP por Trossini e colaboradores (2005), nos quais se constatou a importância da base e do período de reação para a obtenção de melhores rendimentos. O nível +1 representa a proporção NF:K₂CO₃ 1:1, mol/mol, em 3 horas de experimento e o -1 a proporção 1:2, mol/mol, em 11 horas de reação. O 0 (zero), o chamado ponto central, é a média dos níveis -1 e +1. Este ponto teve como parâmetros tempo de 7 horas com proporção NF:K₂CO₃ 1:1,5, mol/mol. A representação esquemática do planejamento pode ser observada na tabela I (página 41). A tabela VIII mostra os 9 experimentos desenvolvidos em duplicata e o ponto central em triplicata, além dos valores de rendimento (%) obtidos na síntese. Pode-se observar que o máximo rendimento ocorreu no ponto central.

Tabela VIII - Planejamento fatorial 3^2 da síntese do NFOH

Exp.	Tempo de reação	Proporção NF:K ₂ CO ₃	Rendimento _I (%)	Rendimento _{II} (%)	Rendimento _{III} (%)	Rendimento _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

Níveis de tempo de reação: 3h (-); 7h (0); 11h (+). Proporção NF:K₂CO₃: 1:1 (-); 1:1.5 (0); 1:2 (+). Rendimento_I e Rendimento_{II} representam os valores em duplicata dos rendimentos. Rendimento_{III} é o valor em triplicata para o ponto central. Rendimento_m é a média dos valores respectivamente.

Os dados descritos foram lançados no programa STATISTICS, licenciado para o Prof. Dr. Roy Edwards Bruns. Um planejamento experimental elaborado para estimar coeficientes, de acordo com um modelo aproximado, deve agrupar certos critérios desejáveis, tendo como principais fatores: gerar boas estimativas para todos os coeficientes, com poucos experimentos e proporcionar condições para a avaliação dos coeficientes e do modelo, ou seja, da regressão e da falta de ajuste (TEÓFILO, FERREIRA, 2006).

A equação 2 descreveu a influência de cada fator utilizado neste planejamento na resposta do modelo (rendimento). Nesta equação, o valor de $\hat{y}$ (%) está relacionado com rendimento previsto, x_1 com o tempo de reação e x_2 com proporção NF/K₂CO₃, mol/mol.

$$\hat{y} = 74.68 - \underset{(\pm 2.46)}{0.89} x_1 - \underset{(\pm 1.52)}{2.91} x_2 - \underset{(\pm 2.52)}{10.11} x_1^2 - \underset{(\pm 2.52)}{15.91} x_2^2 - \underset{(\pm 1.86)}{8.28} x_1 x_2 \quad (\text{Equação 2})$$

x_1 = tempo de reação.

x_2 = proporção NF/K₂CO₃, mol/mol.

A figura 25 mostra a superfície de resposta do modelo quadrático para a equação 2, relacionando o rendimento previsto com as variáveis x_1 e x_2 . Esta metodologia é fundamentada na construção de modelos matemáticos empíricos com funções quadráticas para descrever o planejamento estudado. Dessa maneira, origina dados que permite a exploração (modelar e deslocar) do sistema até a sua otimização (TEÓFILO, FERREIRA, 2006). Pela representação com aspecto elíptico parabólico, percebe-se que a superfície é ligeiramente inclinada para a linha central x_2 , (proporção NF/K₂CO₃, mol/mol), portanto, mudanças na concentração de base podem afetar o resultado da reação. Os pontos máximos observados foram $x_1 = 0,02$ e $x_2 = 0,19$, correspondendo a valores de 6,9 horas e proporção NF:K₂CO₃ 1:1,5, portanto próximos ao ponto central do planejamento.

FIGURA 25 – Superfície resposta para o modelo quadrático, relacionando rendimento previsto com as variáveis x_1 (tempo de reação) e x_2 (proporção NF:K₂CO₃, mol/mol).

Sabe-se que a síntese do NFOH não aconteceria na ausência de K₂CO₃, necessário para a desprotonação da amida primária do NF (A-figura 26). Porém, um excesso deste reagente (observados em todos os resultados da relação 1:2) pode ter sido o responsável pela decomposição do NFOH e queda do rendimento da reação, uma vez que a base pode atacar o H ácido da OH para a formação do ânion *N*-hidroximetil (B-figura 26). Este intermediário sofre a clivagem da ligação N-C para a liberação de formaldeído e formação do material de partida, NF (FRISS, BUNDGAARD, 1996). Em adição, é importante ressaltar que, como visto no planejamento fatorial, o

tempo de reação também está relacionado na reversão do NFOH em NF, afetando os resultados de acordo com sua variação.

FIGURA 26 – A) Mecanismo da reação de hidroximetilação do NF. B) Mecanismo de decomposição do NFOH (adaptado de FRISS, BUNDGAARD, 1996).

As reações foram realizadas ao abrigo da luz devido à fotossensibilidade do nitrofural. Os produtos foram caracterizados no IV e RMN. O espectro 1, no IV, mostrou bandas características deste produto, por exemplo, uma em 1674 cm^{-1} , relacionada

com a deformação de grupo carbonila de amidas, 1526 e 1361 cm^{-1} com as deformações assimétrica e simétrica, respectivamente de grupo nitro.

Espectro 1: Espectro no IV 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).

O espectro 2, de RMN de ^1H , mostra sinais característicos do NFOH, por exemplo, um tripleto em 4,61 ppm, relacionado com o 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, tem um sinal em 62,97 ppm, relativo ao carbono do grupo CH_2 deste derivado hidroximetilado.

Espectro 2: Espectro de RMN ^1H do NFOH.

^1H -RMN (DMSO), 300 MHz, δ = ppm

2,50 (DMSO); 3,32 (H_2O); 4,61 (t, 2H_8 , $J = 6$ Hz); 5,49 (t, 1H_{OH} , $J = 6$ Hz); 6,61 (s, 1H_6); 7,24 (d, 1H_3 , $J = 3$ Hz); 7,64 (d, $1\text{H}_{\text{CO-NH}}$, $J = 6$ Hz); 7,80 (t, 1H_4 , $J = 3$ Hz); 11,00 (s, $1\text{H}_{\text{N-NH}}$).

Espectro 3: Espectro de RMN ^{13}C do NFOH.

^{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).

Algumas das dificuldades desta rota sintética estão na etapa de filtração (após o tempo total de reação) e purificação do produto. A filtração deve ser realizada com metanol e água a frio, o que pode estar relacionado com a perda de produto, pois o nitrofural e o derivado hidroximetilado possuem certa solubilidade neste solvente. Porém, esta etapa é necessária para a retirada do excesso do formaldeído. Álcoois adicionam-se a carbonilas de aldeídos e cetonas, formando hemiacetais e hemicetais, respectivamente (figura 27) (ALLINGER *et al.*, 1976).

FIGURA 27 - Formação de hemiacetal.

4.3 MÉTODOS UTILIZADOS NA TENTATIVA DE OBTENÇÃO DO ÁCIDO 2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-1,3-DIOXOLAN-4-ILA) ACÉTICO

Este composto foi planejado com o intuito de se promover seletividade da carbonila a reagir com o inositol ou NFOH e, assim, evitar reações cruzadas passíveis de acontecer quando da não proteção destes grupos funcionais.

Utilizando-se o método A não houve a formação do ácido L(-)-málico protegido. Primeiramente, a falha pode ter ocorrido na utilização da piridina, ao invés de *p*-toluenossulfonato de piridínio, como descrito por Sterling e colaboradores (1987). Após 72 h de reação adicionaram-se mais 0,05 mL de piridina e quantidade suficiente de 2,2-dimetoxipropano. O objetivo desta estratégia foi aumentar a quantidade de base, facilitando a captação de prótons da reação. Após 96 h, não houve a solubilização do ácido L(-)-málico. As determinações da faixa de fusão, rendimento da reação e análise espectroscópica não foram realizadas.

O método B apresentou as mesmas proporções estequiométricas de A, porém a reação foi mantida em refluxo por 24 h. O produto obtido foi um sólido marrom,

provavelmente pelo longo tempo em refluxo. Para este produto, também não foi determinada faixa de fusão, rendimento da reação e análises espectroscópicas.

No método C, em que o meio reacional foi mantido sob refluxo por 2 h, pode-se perceber a formação de um possível produto em CCD (acetato de etila), com $R_f=0,36$, diferente dos compostos de partida (ácido L(-)-málico $R_f=0,04$; 2,2-dimetoxipropano $R_f=0,1$, piridina $R_f=0,2$). Este produto foi purificado por cromatografia em coluna, com o eluente acetato de etila. O IV mostrou bandas características COOH (1740 cm^{-1}), lactona (1789 cm^{-1}). O RMN não foi conclusivo por apresentar excesso de sinais, que podem ter sido causados por impurezas.

O método D foi realizado com maior proporção de piridina, em relação ao C. Após análise das possíveis misturas de solventes para a coluna cromatográfica, o produto foi purificado com a mistura clorofórmio/metanol (2:1, v/v). Este método não foi bem-sucedido, porque o IV das frações obtidas na cromatografia não mostrou bandas características do ácido L(-)-málico protegido.

A diferença entre os métodos E e D está na fase móvel da coluna cromatográfica. No método E, utilizou-se acetato de etila como eluente para avaliar a influência do solvente na separação dos produtos da mistura reacional. Verificaram-se bandas características do produto desejado no IV, porém as frações obtidas na coluna cromatográfica não foram suficientes para análise de RMN.

Pelo método F, o ácido L(-)-málico, piridina e dimetoxipropano foram mantidos sob agitação à temperatura ambiente. Obteve-se líquido viscoso amarelo, que mostrou bandas características no IV. Tentou-se a purificação do produto com solução de hexano/diclorometano (1;1, v/v). Houve a formação de duas fases (aquosa e oleosa). Ambas foram submetidas a análises no IV. A fração aquosa mostrou bandas características do possível composto (C=O de COOH em 1731 cm^{-1} , C=O de lactona a 1797 cm^{-1}). A fração oleosa apresentou as bandas C=O de COOH 1730 cm^{-1} e C=O de lactona a 1791 cm^{-1} . No entanto, as características do produto não foram aquelas descritas por Sterling e colaboradores (1987). A dúvida seria a utilização do *p*-toluenossulfonato de piridínio. Dessa maneira, partiu-se para o método G, que utilizou esse reagente.

No método G, utilizou-se o *p*-toluenossulfonato de piridínio necessário para a reação, como descrito por Sterling e colaboradores (1987). A análise no IV do produto obtido mostrou a presença de bandas características de deformação axial assimétrica de S=O de sulfonato (1185 cm^{-1}), porém não mostrou sinais característicos de lactona e ácido carboxílico.

O produto obtido pelo método H apresentou resultados de IV, RMN e ponto de fusão semelhante aos descritos por Green e colaboradores (2000). No IV (espectro 4), pode-se observar as bandas principais em 1765 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 $1,53\text{ ppm}$ relativo às metilas do ácido málico protegido, que não estão presentes no material de partida, o ácido L(-)-málico. Já o espectro 6 (de ^{13}C), mostra os sinais em $25,14\text{ ppm}$, $25,87\text{ ppm}$ e $35,04\text{ ppm}$, que caracterizam o produto desejado.

O rendimento da reação para o produto impuro foi de 75%. Após a purificação, este valor caiu para 37%.

Espectro 4 : Espectro no IV do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético.

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 do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético.

RMN ¹H (DMSO), 300 MHz, δ = ppm

2,51 (DMSO); 3,34 (H₂O); 1,53 (s, 6 H₄,H₅); 2,76 (t, 2H₂, J=3 Hz); 4,80 (t, 1H₃, J=6 Hz); 12,61 (s, OH, 1H).

Espectro 6: Espectro de RMN ^{13}C do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético.

^{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_1); 172,71 (C_4).

Como o rendimento máximo na obtenção do ácido L(-)-málico protegido foi de aproximadamente 37%, novas técnicas foram aplicadas na tentativa de melhorar este resultado. O esquema de síntese foi o mesmo que o descrito por Green e colaboradores (2000), variando apenas o tempo de reação. O primeiro experimento foi realizado em 3 horas (método I). Os resultados obtidos por espectroscopia no IV mostraram bandas características de lactona (1764 cm^{-1}) e ácido carboxílico (1728 cm^{-1}), como o esperado para o produto proposto. Porém, o espectro de RMN ^1H mostrou excesso de sinais, principalmente na região de 4,27 ppm. Em adição, o espectro de ^{13}C apresentou muitos sinais na região próxima a 170 ppm. Ambos os resultados podem representar a presença do material de partida, ácido L(-)-málico. Em 6 horas de reação (método J), os resultados não foram diferentes. O IV mostrou bandas características para o ácido L(-)-málico protegido (1773 cm^{-1} para a lactona e 1728 cm^{-1} para o ácido carboxílico). De maneira semelhante, pela análise de RMN ^1H do produto resultante por metodologia anterior, observaram-se sinais na região de 4,70 ppm, que poderiam estar relacionados com o material de partida. Em 24 horas de reação (método L), observou-se, pelo IV, que o produto não foi obtido. Este mostrou banda de ácido carboxílico (1740 cm^{-1}) e, muito discretamente, uma relacionada com a proteção dos grupos funcionais ácido e álcool (1791 cm^{-1}). Não foi realizado RMN para este produto.

4.4 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO DE HIDROXIMETILNITROFURAL ÁCIDO 2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-1,3-DIOXOLAN-4-ILA)ACÉTICO (adaptado de DAMEN *et al.*, 2000).

Nesta etapa sintética, o meio reacional permaneceu 9 dias sob agitação e à temperatura ambiente. Verificou-se formação de possível produto com $R_f=0,1$ (em clorofórmio/metanol/ácido acético, 85:10:5, v/v/v), sendo diferente dos valores de NFOH, com $R_f=0,44$, e ácido L(-)-málico protegido $R_f=0,42$. O IV do produto impuro mostrou as bandas de 1766 e 1794 cm^{-1} , relacionadas, possivelmente, com ácido éster e lactonas, respectivamente (espectro 7). Devido ao grande período reacional, procurou-se nova alternativa de síntese para os intermediários necessários para a

construção do dendrímero. A Modelagem molecular auxiliou na compreensão desta rota sintética.

Espectro 7: Espectro no IV da reação entre ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético e NFOH.

IV (ν , KBr, cm^{-1})

3341 (ν_{NH} amida secundária); 1794 ($\nu_{\text{C=O}}$ de lactona); 1766 ($\nu_{\text{C=O}}$ éster); 1627 ($\nu_{\text{C=O}}$ amida); 1527 (ν_{NO_2} assimétrica); 1393 (ν_{NO_2} simétrica); 1451 (δ_{CH_3} angular assimétrica); 1393 (δ_{CH_3} angular simétrica).

4.5 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO INOSITOL E ÁCIDO 2-(2,2-DIMETIL-5-OXO-1,3-DIOXOLAN-4-ILA)ACÉTICO (adaptado de DAMEN *et al.*, 2000).

No método A utilizou-se DCC/DMAP, verificando-se, após 7 horas de reação, a possível formação do intermediário inositol e ácido málico protegido. O IV foi realizado com o produto impuro em solução de DMF e apresentou bandas características do produto desejado, porém, também uma em 1672 cm^{-1} , que pode estar relacionada com o subproduto formado durante a reação, a *N,N'*-dícicloexiluréia (DCU).

O método B foi realizado com a finalidade de se avaliar o comportamento dos reagentes frente ao agente condensante EDC. Obtiveram-se, após a extração com água e diclorometano, duas frações: orgânica e aquosa. A porção aquosa foi submetida à liofilização e o produto obtido foi analisado no IV. Não foram observadas bandas características do intermediário inositol e ácido málico protegido. Porém, verificou-se uma na região de 1652 cm^{-1} , que pode estar relacionada com a amida presente no EDU (1-(3-diaminopropil)uréia), produto secundário formado na utilização de EDC. A fração orgânica, após análise em IV, apresentou bandas relativas aos grupos funcionais desejados: lactona (1790 cm^{-1}) e éster (1731 cm^{-1}). Registrou-se o aparecimento de uma banda em 1651 cm^{-1} , que pode ser de amida relativa ao EDU. Na tentativa de se obter um composto com ausência de subproduto, foram realizadas mais 5 extrações da porção orgânica com água. Posteriormente, o solvente orgânico foi retirado e o produto analisado no IV. Houve a manutenção das bandas desejadas: em 1790 cm^{-1} (lactona) e em 1739 cm^{-1} (éster). No entanto, manteve-se uma em 1644 cm^{-1} , evidenciando a provável presença de EDU no composto obtido. Devido às subseqüentes extrações realizadas, a quantidade de produto final não foi suficiente para dar continuidade nas reações posteriores. Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada durante toda a reação. Após 3 horas, pode ser verificada a formação de dois produtos com *R_f* de 0,2 e 0,7.

A solubilidade do inositol, segundo The Merck Index (1989), é: água, levemente solúvel em álcool e praticamente insolúvel em éter e outros solventes orgânicos usuais. Dessa maneira, a partir do método C foi utilizada agitação mecânica para melhorar as

condições reacionais, uma vez que o inositol não se mostrou solúvel no solvente escolhido para as reações, o THF.

Na primeira tentativa para a obtenção do produto inositol-ácido L(-)-málico protegido com agitação mecânica (método C), utilizou-se sistema aberto. Problemas como evaporação de THF, devido à agitação vigorosa, foram observados. A cada uma hora, era necessária a adição de 50 mL de solvente. O espectro no IV do produto bruto mostrou bandas características de ácido carboxílico (1713 cm^{-1}) e amida (1627 cm^{-1}). Duas justificativas são aceitas para estes dados: primeira, o ácido L(-)-málico protegido não suportou as condições do meio reacional. A lactona foi rompida, desaparecendo a banda característica deste grupo funcional (aproximadamente 1760 cm^{-1}). Segundo, a banda de 1627 cm^{-1} pode estar relacionada com o produto secundário formado durante a reação, DCU. Formou-se um precipitado no meio reacional, analisado no IV. Banda característica em 1627 cm^{-1} pode ser devida, possivelmente, ao DCU. O espectro de RMN ^1H não foi conclusivo por mostrar excesso de sinais. Verificou-se um sinal característico do ácido L(-)-málico protegido, em aproximadamente 1,5 ppm, porém o mesmo pode estar relacionado com o cicloexano da *N,N'*-dicicloexiluréia.

No segundo experimento com agitação mecânica para obtenção deste intermediário (método D) utilizou-se sistema fechado à temperatura ambiente. Não houve a evaporação do solvente durante a reação. Formaram-se de dois produtos durante o processo, um solúvel e um sólido de coloração marrom. As principais bandas do espectro de IV para o produto solúvel foram: 1726 cm^{-1} , possivelmente representando a função éster, e 1639 cm^{-1} , uma amida (provavelmente do produto secundário-EDU). Estes dados podem representar a quebra da lactona durante a reação, o que explicaria o desaparecimento da banda por volta de 1760 cm^{-1} . Por outro lado, pode estar havendo a formação do éster e, posteriormente, o rompimento do anel. A análise do precipitado no IV mostrou bandas em 1782 cm^{-1} e 1647 cm^{-1} , podendo estar relacionadas com lactona e amida. Placas cromatográficas, em 8 horas de reação, mostraram duas manchas para ambos os produtos (solúvel e insolúvel), com *R_f* de 0,06 e 1; 0,06 e 0,3, respectivamente. As análises conjuntas dos dados demonstraram a provável formação de um éster. Porém, formaram-se 3 produtos, que necessitam ser isolados e caracterizados para a conclusão do sucesso ou não da reação.

Para a escolha da melhor fase móvel para a reação (tabela IX), utilizaram-se os seguintes sistemas:

Tabela IX - Escolha da fase móvel para o acompanhamento da reação de obtenção do intermediário inositol e ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético.

Solventes	Proporção (v/v)
Clorofórmio	-
Metanol	-
Acetato de etila	-
Diclorometano	-
Hexano	-
Acetona	-
Clorofórmio/metanol	1:1
	19:1
	1:19
Acetona/hexano	1:1
	2:1
	1:2
Acetato de etila/hexano	1:1
	2:1
	1:2

O melhor deslocamento das amostras em CCD de ácido L(-)-málico, ácido L(-)-málico protegido, provável DCU obtido e provável produto obtido ocorreu em clorofórmio/metanol 1:19 (v/v).

A diferença entre os métodos D e E é a utilização do agente condensante DCC em E. O esquema reacional empregado foi o mesmo. As bandas mais características observadas no IV foram 1771, 1728 e 1626 cm^{-1} , que podem estar relacionadas com as funções: lactona, éster e amida (DCU-subproduto) (espectro 8).

Espectro 8: Espectro no IV do produto impuro da reação entre inositol e ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético.

IV (ν , KBr, cm^{-1})

3327 (ν_{OH} álcool); 1771 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactona); 1728 ($\nu_{\text{C=O}}$ éster); 1626 ($\nu_{\text{C=O}}$ de amida); 1243 ($\delta_{\text{C-O}}$ álcoois); 1436 (δ_{CH_3} angular assimétrica); 1345 (δ_{CH_3} angular simétrica).

O intermediário formado pelo inositol e ácido L(-)-málico foi analisado também por CLAE. Comparações com os produtos: ácido L(-)-málico, ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético e provável DCU, permitiram a obtenção de informações sobre a composição deste intermediário. O cromatograma apresentou sinais em 2,4; 3,2; 4,5; 5,9; 11,3; 14,3 minutos, que podem estar relacionados com o ácido L(-)-málico. Em

1,600; 6,250 e 6,622 minutos apareceram sinais do provável DCU. Existem indícios da presença do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético, verificados com a presença de sinais em 1,8; 2,4 e 2,6 minutos.

O espectro de RMN ^1H (espectro 9) apresentou excesso de sinais porque o produto estava impuro. Porém, existem algumas evidências de que a síntese foi realizada com sucesso. A formação de um dubleto em 1,65 ppm pode estar relacionada com os H_4 ou H_5 do ácido málico protegido.

Espectro 9: Espectro de RMN ^1H do produto impuro da reação entre o ácido málico-1,2-O-isopropilideno e o inositol.

A análise do espectro de ^{13}C (espectro 10) forneceu dados que podem demonstrar a obtenção do produto desejado. Os sinais 23,48 e 23,83 ppm são próximos aos dos carbonos C_6 e C_7 do padrão ácido málico protegido (25,87 e 25,14 ppm, respectivamente).

Espectro 10: Espectro de RMN ^{13}C do produto impuro da reação entre o ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético e o inositol.

O espectro no IV (espectro 11) do produto obtido em F apresentou as principais bandas de 1794 cm^{-1} , 1738 cm^{-1} e 1628 cm^{-1} . Como já discutido anteriormente, é provável que o composto desejado tenha sido obtido, porém há a banda de amida do produto secundário. A análise do precipitado formado durante a reação mostra uma banda característica de amida em 1626 cm^{-1} .

Espectro 11: Espectro no IV do produto impuro da reação entre o ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético e o inositol.

IV (ν , KBr, cm^{-1})

3328 (ν_{OH} álcool); 1794 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactona); 1738 ($\nu_{\text{C=O}}$ éster); 1628 ($\nu_{\text{C=O}}$ de amida); 1274 ($\delta_{\text{C-O}}$ álcoois); 1449 (δ_{CH_3} angular assimétrica); 1386 (δ_{CH_3} angular simétrica).

O espectro de ^1H (espectro 12) mostrou um dubleto em 1,62 ppm, que pode ser referente ao H_4 ou H_5 do ácido málico protegido. Os sinais em 25,27 e 25,38 ppm no espectro de ^{13}C (espectro 13) podem estar relacionados aos carbonos 6 e 7 do ácido málico protegido.

Espectro 12: Espectro de RMN ^1H do produto impuro da reação entre o ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético e o inositol.

Espectro 13: Espectro de RMN ^{13}C do produto impuro da reação entre o ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético e o inositol.

Dessa maneira, com a evidência de que o intermediário proposto foi obtido, a etapa posterior, abertura do anel do ácido málico protegido, foi realizada. O produto sintetizado com as condições reacionais descritas anteriormente foi analisado no IV (espectro 14). O desaparecimento da banda na região de 1794 cm^{-1} pode sugerir a ruptura da lactona. Além disso, não foi observado no espectro 15, de RMN ^1H , um duplete característico em 1,62 ppm. O espectro 16, de ^{13}C , auxiliou na compreensão destes resultados pelo desaparecimento de um sinal em 111,13 ppm, correspondente ao C_5 do ácido málico protegido.

Espectro 14: Espectro no IV do produto impuro da reação entre o ácido L(-)-málico e o inositol.

IV (ν , KBr, cm^{-1})

3328 (ν_{OH} álcool); 1750 ($\nu_{\text{C=O}}$ éster); 1679 ($\nu_{\text{C=O}}$ de amida); 1431 (δ_{CH_3} angular assimétrica); 1315 (δ_{CH_3} angular simétrica).

Espectro 15: Espectro de RMN ¹H do produto impuro da reação entre o ácido L(-)-málico e o inositol.

Espectro 16: Espectro de RMN ^{13}C do produto impuro da reação entre o ácido L(-)-málico e o inositol.

4.6 SÍNTESE DO DENDRÍMERO DE PRIMEIRA GERAÇÃO

Uma vez obtido o intermediário, partiu-se para a obtenção do dendrímero de primeira geração, com adição de NFOH. Deve-se ressaltar que este intermediário não foi purificado porque não apresentou deslocamento satisfatório em cromatografia de camada delgada com os solventes orgânicos usuais. O método A teve como agente condensante o DCC e DMAP como catalisador. A reação foi acompanhada com cromatografia de camada delgada. Pôde-se observar que, após 12 horas de reação, formaram-se 3 manchas relativas ao produto. Duas delas estão diretamente relacionadas com os produtos de partida (intermediário inositol e ácido L(-)-málico e NFOH), por apresentarem os mesmos valores de R_f . A de deslocamento intermediário, provavelmente, está relacionada com a decomposição do NFOH. Análise do espectro de ^1H mostrou sinais que podem estar relacionados com a molécula de NFOH, como um tripleto em 4,62 ppm (relativos ao grupo CH_2 deste composto) e um dubleto em 5,61 ppm (relativos à OH). É importante ressaltar que estes sinais não estão presentes no espectro de ^1H do intermediário inositol e ácido L(-)-málico.

O método B utilizou como agente condensante EDC e DMAP como catalisador. Apresentou o mesmo comportamento que o método A em CCD (com 3 manchas características). Pôde-se observar no espectro de ^1H um tripleto em 4,62 ppm e um dubleto em 4,54 ppm, provavelmente relacionados com a molécula de NFOH, como descrito anteriormente.

O agente condensante DCI também não gerou resultados satisfatórios na obtenção do dendrímero de primeira geração. O comportamento cromatográfico se manteve. Portanto, não foi obtido o produto desejado.

4.7 ESTERIFICAÇÃO DO DERIVADO HIDROXIMETILNITROFURAL

Para as tentativas de esterificação do NFOH, desenvolveram-se 6 metodologias. A primeira, método A, teve como reagentes cloreto de acetila e NFOH. Após 24 horas de reação, pode-se perceber que o produto não havia sido obtido porque a CCD apresentou apenas mancha relacionada com o material de partida, NFOH. Sendo assim, não foram realizadas as análises no IV e RMN.

A diferença do método B para o A é a utilização de ácido sulfúrico concentrado (3 gotas) como catalisador. Partiu-se de uma quantidade pequena de reagentes e após 4 horas de reação, foi verificada apenas uma mancha na CCD relacionada com o nitrofural. Portanto, houve a decomposição do material de partida e a síntese não foi realizada com sucesso.

Na tentativa de se verificar a influência do ácido na degradação do NFOH foi realizado o método C. Neste, a quantidade de H_2SO_4 foi menor em maiores proporções molares de reagentes. O tempo de reação foi de 12 horas e mais uma vez, a CCD mostrou apenas manchas relacionadas ao NFOH e seu produto de decomposição, NF. Foi feito o IV do produto obtido, mas pode-se observar apenas uma banda em 1698 cm^{-1} , provavelmente relacionada com a função amida do material de partida. Nenhuma banda foi observada na região de 1720 cm^{-1} , portanto não houve a formação de um éster.

O método D foi feito com H_2SO_4 20% para avaliar a influência da concentração de ácido na estabilidade do NFOH. Como no método C, após 12 horas de reação, a CCD apresentou manchas relativas ao NF e NFOH. O IV mostrou uma banda principal em 1690 cm^{-1} , e nenhuma na região de 1720 cm^{-1} .

No método E, tentou-se mimetizar a síntese do AAS. Nesta síntese, utiliza-se H_2SO_4 como catalisador. Outra função deste reagente é cindir uma ligação hidrogênio intramolecular existente entre a função ácido e álcool do material de partida, ácido salicílico. Como em Modelagem Molecular foi verificada ligação hidrogênio importante entre o OH e função semicarbazona do NFOH, o objetivo desta metodologia foi a formação de um éster em meio ácido após esta interação ter sido cindida. O resultado de IV para o precipitado formado durante a reação apresentou uma banda em 1780

cm^{-1} , que pode estar relacionada com vibrações de deformação axial de C=O de anidridos (espectro 17). Por outro lado, o IV da solução após a rotaevaporação não mostrou uma banda na região de 1720 cm^{-1} . O espectro 18 de RMN ^1H não apresentou um tripleto na região próxima a 5,50 ppm, relacionado com a OH do NFOH. Porém, mostrou um tripleto na região de 4,68 ppm que pode estar relacionado com CH_2 do derivado hidroximetilado. Além disso, a CCD mostrou mancha diferente do material de partida, NFOH e de seu produto de degradação, NF. A junção de todas as análises demonstra a provável obtenção do produto desejado, ou seja, um éster entre o NFOH e anidrido succínico.

Espectro 17: Espectro no IV do produto impuro do precipitado formado durante a reação entre anidrido succínico e NFOH.

IV (ν , KBr, cm^{-1})

2966 ($\nu_{\text{ass}} \text{CH}_2$); 1781 ($\nu_{\text{C=O}}$ anidrido); 1691 ($\nu_{\text{C=O}}$ de amida); 1518 ($\nu_{\text{ass}} \text{NO}_2$ aromático); 1352 ($\nu_{\text{sim}} \text{NO}_2$ aromático); 1051 ($\delta_{\text{C-O}}$ anidrido).

Espectro 18: Espectro de RMN ^1H do produto impuro da reação entre o anidrido succínico e NFOH.

O provável resultado positivo para a reação anterior, originou o método F, com o ácido málico protegido como material de partida. A reação permaneceu em agitação por 48 horas e a CCD apresentou duas manchas, uma relacionada com o NF, e outra com um produto de reação que apresentou um valor de R_f diferente do NFOH. No IV, pode-se observar uma banda em 1729 cm^{-1} , que pode estar relacionada com a função éster resultante da reação do ácido málico e o NFOH (espectro 19). A ausência de um sinal em 5,49 ppm (relacionado com a OH do NFOH) no espectro 20 de RMN ^1H pode evidenciar a obtenção de um produto de reação com esta metodologia. Em adição, houve a manutenção do grupo CH_2 do derivado hidroximetilado, observada pela presença de tripleto na região de 4,20 ppm (espectro 20).

Espectro 19: Espectro no IV do produto impuro da reação entre ácido málico protegido e NFOH.

IV (ν , KBr, cm^{-1})

1729 ($\nu_{\text{C=O}}$ éster); 1675 ($\nu_{\text{C=O}}$ de amida); 1519 ($\nu_{\text{ass NO}_2}$ aromático); 1467 (δ_{CH_2} angular simétrica); 1326 (δ_{OH} angular); 1359 ($\nu_{\text{sim NO}_2}$ aromático); (1249 ($\delta_{\text{O-H}}$ axial de álcoois)).

Espectro 20: Espectro de RMN ^1H do produto impuro da reação entre o ácido málico protegido e NFOH

Partiu-se para a tentativa de obtenção do dendrímero de primeira geração, uma vez que houve indícios da formação do intermediário ácido L(-)-málico e NFOH. A reação foi realizada em meio ácido com a adição de inositol. Análises no IV demonstraram a não obtenção do produto desejado pela ausência de um sinal relacionado com a função éster próximo à região de 1720 cm^{-1} .

4.8 SÍNTESE DO ANIDRIDO DO ÁCIDO MÁLICO PROTEGIDO

Tendo evidências da obtenção de um éster da reação entre o anidrido succínico e NFOH, o objetivo desta etapa sintética foi a tentativa de formação de um anidrido do ácido málico protegido, tornando-o mais reativo para a esterificação com o derivado hidroximetilado. A maior reatividade dos anidridos pode ser melhor compreendida pelas seguintes estruturas de ressonância (figura 28):

FIGURA 28 – Estruturas de ressonância de derivados de ácidos (ALLINGER *et al.*, 1976).

O par de elétrons em Y está deslocalizado parcialmente pelo grupo carbonila (estrutura III). A adição de um nucleófilo à carbonila ocorre mais rapidamente e completamente com o aumento da carga positiva no carbono da carbonila. A forma de ressonância da estrutura III diminui a importância de II, já que tende a retirar a carga positiva da carbonila. Sendo assim, a reatividade será menor com o aumento da importância da estrutura III. Átomos menos eletronegativos como N têm maior tendência em compartilhar seus elétrons que, por exemplo, o oxigênio que é mais eletronegativo. A estrutura III tem, portanto, maior importância para as amidas que ésteres. No caso dos anidridos, o oxigênio central compartilha seus elétrons com duas carbonilas, reduzindo a importância da forma de ressonância III, o que torna estes compostos mais reativos (ALLINGER *et al.*, 1976).

A síntese do anidrido do ácido málico protegido foi analisada em IV e RMN ^1H . O IV apresentou uma banda em 1728 cm^{-1} , que pode estar relacionada com a função éster necessária para a obtenção do produto desejado. Por outro lado, no RMN ^1H , não foi observado um dubleto na região de 1,5 ppm característico das metilas do derivado de ácido protegido. Provavelmente houve a abertura do anel durante o procedimento. O problema desta etapa sintética foi o baixo rendimento da reação e toda a amostra foi utilizada nas análises espectroscópicas. Novas metodologias foram testadas.

4.9 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO ÁCIDO L(-)-MÁLICO E NFOH, A PARTIR DE UM ANIDRIDO MISTO

O objetivo desta reação foi obter, em uma única etapa o anidrido misto do ácido L(-)-málico e o éster do ácido L(-)-málico com o NFOH. A CCD mostrou duas manchas muito evidentes relacionadas com NFOH e NF. Havia uma terceira, com menor intensidade e R_f maior que o NF. Porém, devido ao grande período sintético (aproximadamente 20 horas de reação), optou-se em utilizar uma nova metodologia para a obtenção do intermediário ácido L(-)-málico e NFOH.

4.10 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO ÁCIDO MÁLICO PROTEGIDO E *p*-NITROFENOL

O objetivo da reação entre o ácido málico protegido e *p*-nitrofenol foi gerar um composto com maior reatividade para a etapa posterior, reação com NFOH. O grupo nitro, forte retirador de elétrons, aumentaria a carga positiva no carbono da carbonila, facilitando o ataque nucleofílico do oxigênio da OH do derivado hidroximetilado. O produto da síntese entre o ácido e *p*-nitrofenol, apresentou, no IV, uma banda em 1770 cm^{-1} , que poderia estar associada à função éster. Seu deslocamento da região de 1720 cm^{-1} pode estar relacionado com a presença do grupo nitro no composto sintetizado. O espectro 21 mostra este resultado.

Espectro 21: Espectro no IV do produto impuro da reação entre ácido málico protegido e *p*-nitrofenol.

IV (ν , KBr, cm^{-1})

3394 ($\nu_{\text{N-H}}$ axial de amidas); 2935, 2858 (ν_{CH} CH_2 , CH_3); 1770 ($\nu_{\text{C=O}}$ éster ou $\nu_{\text{C=O}}$ lactona); 1681 ($\nu_{\text{C=O}}$ de amida); 1518 (ν_{ass} NO_2 aromático); 1449 (δ_{CH_2} angular simétrica); 1338 (ν_{sim} NO_2 aromático).

A etapa seguinte foi a reação com derivado hidroximetilado para a obtenção do intermediário ácido L(-)-málico e NFOH. O ácido sulfúrico concentrado teria duas funções: quebrar a ligação hidrogênio intramolecular do NFOH (entre a OH e função semicarbazona) e a abertura do anel do ácido málico protegido. O esquema de reação pode ser observado na figura 29.

FIGURA 29 – Esquema de reação para obtenção de éster com derivado de *p*-nitrofenol.

A CCD do produto obtido apresentou apenas uma mancha com mesmo R_f do NF. Interessante ressaltar que o IV mostrou bandas semelhantes ao éster do ácido málico protegido e *p*-nitrofenol, evidenciando a não obtenção do produto desejado. A comparação dos resultados em IV, do produto e material de partida, pode ser vista no espectro 22. O RMN 1H não apresentou sinais relacionados com OH e CH_2 do NFOH, e com os grupos CH_3 do ácido málico protegido.

Espectro 22: Comparações de espectros no IV do éster do ácido málico protegido e *p*-nitrofenol e produto da reação com NFOH.

4.11 HALOGENAÇÃO DO NFOH

O objetivo desta reação foi obter um intermediário do NFOH halogenado e mais reativo. O cloro, por ser um bom grupo de saída facilitaria a reação posterior com o ácido málico protegido (figura 30).

FIGURA 30 – Esquema de reação para obtenção de um éster a partir de um composto halogenado (adaptado de ALLINGER *et al.*, 1976).

A CCD do produto da reação de halogenação do NFOH apresentou duas manchas com mesmos valores de R_f do NF e NFOH. Dados espectroscópicos no IV mostraram uma banda em 1693 cm^{-1} e 1724 cm^{-1} , que podem estar relacionadas com as amidas do material de partida e de seu produto de degradação (NFOH e NF, respectivamente). Houve a formação de um tripleto em $4,65\text{ ppm}$, que pode ser um indício da presença do grupo CH_2 do NFOH.

4.12 HALOGENAÇÃO E ALQUILAÇÃO DO NF

Na metodologia anterior, utilizou-se o NFOH como material de partida. Verificou-se a instabilidade e pouca reatividade deste composto nas condições reacionais. Sendo assim, o objetivo desta etapa sintética foi a tentativa de obtenção de um derivado do NF com o grupo CH_2 e um halogênio na porção terminal da cadeia. No método A, a reação foi mantida sob agitação por 6 dias. Após esse período, a CCD apresentou mancha com valor de R_f idêntico ao do NF. O RMN ^1H mostrou sinais semelhantes ao NF, verificados no espectro 22.

Espectro 22: Espectro de RMN ¹H do produto obtido pelo método A.

¹H-RMN (DMSO), 300 MHz, δ = ppm

2,50 (DMSO); 3,45 (H₂O); 6,60 (s, 1H_{CO-NH}); 7,23 (d, 1H₃, J = 3 Hz); 7,78 (t, 1H₆, 1H₄, J = 3 Hz); 10,78 (s, 1H_{N-NH}).

A diferença do método A para o B foi a utilização da piridina no segundo. Este reagente funcionaria como catalisador e evitaria que o meio se tornasse ácido com a formação de HBr. O sistema permaneceu sob agitação por 50 horas. A análise de CCD mostrou apenas uma mancha como produto da reação, com mesmo deslocamento do NF. No IV deste produto, após a rotaevaporação do solvente orgânico, verificaram-se bandas semelhantes às observadas no espectro do material de partida. Portanto, a reação não obteve sucesso.

Na CCD do produto do método C, após 6 dias de reação, houve a formação de uma mancha com mesmo deslocamento que o NF. Análises espectroscópicas não foram realizadas e partiu-se para uma nova metodologia para a obtenção do produto desejado. O resultado da CCD do método D foi semelhante ao observado no C, portanto, a alquilação e halogenação do NF não foi obtida. O método E teve como finalidade a síntese do derivado halogenado do NF partindo-se de um procedimento semelhante ao utilizado para a obtenção do NFOH. Clorotrimetilsilano (TMSCl) foi usado como reagente e adicionado em duas porções, no início da reação e depois de 7 horas de agitação à temperatura ambiente. Esse intervalo de tempo foi escolhido, pois verificou-se que o melhor rendimento para a síntese de NFOH foi em 7 horas. A CCD do produto da reação, após 6 dias de agitação, mostrou apenas uma mancha com deslocamento semelhante ao do NF. Portanto, concluiu-se que o produto não foi obtido.

4.13 SÍNTESE DO DENDRÍMERO FORMADO PELO INOSITOL, ÁCIDO MÁLICO E CLORANFENICOL (PATENTE)

Esta síntese foi utilizada como modelo a ser patenteado, de dendrímero em que o fármaco faz parte do *dendron*, o que se constitui em uma inovação desse trabalho. Assim, como ainda não foi possível obter o dendrímero de NFOH, escolheu-se derivado mais reativo, como o cloranfenicol. Este existe na terapêutica como hemissuccinato sódico, e, portanto, apresenta comprovada reatividade na formação de éster.

4.13.1 Síntese do intermediário ácido málico protegido e cloranfenicol

Observaram-se bandas características do produto intermediário no IV (espectro 24) em 1793 e 1735 cm^{-1} , que podem estar relacionadas com as funções: lactona, éster, respectivamente, observados na figura 31.

FIGURA 31 - Intermediário ácido málico protegido e cloranfenicol.

Espectro 23: Espectro no IV do intermediário ácido málico protegido e cloranfenicol.

IV (v, KBr, cm⁻¹)

3395 ($\nu_{\text{O-H}}$ álcool); 2858, 2827 (ν_{CH} CH_2 , CH_3); 1793 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactona); 1743 ($\nu_{\text{C=O}}$ de éster); 1735 ($\nu_{\text{C=O}}$ de ácidos carboxílicos); 1520 ($\nu_{\text{ass NO}_2}$ aromático); 1458 (δ_{CH_2} angular simétrica); 1348 ($\nu_{\text{sim NO}_2}$ aromático e δ_{OH} angular).

4.13.2 Desproteção do intermediário cloranfenicol e ácido málico protegido (Damen *et al.*, 2000)

Com a evidência de que o intermediário proposto foi obtido, a etapa posterior, abertura do anel do ácido málico protegido, foi realizada. O produto sintetizado foi analisado no IV (espectro 24). O desaparecimento da banda na região de 1793 cm^{-1} indica a provável ruptura da lactona, comprovada pelo aparecimento das bandas em 1728 e 1712 cm^{-1} , caracterizando, respectivamente, as funções éster e ácido deste intermediário, como pode ser observado na figura 32.

FIGURA 32 - Intermediário ácido L(-)-málico e cloranfenicol.

Espectro 24: Espectro no IV do intermediário ácido málico e cloranfenicol.

IV (ν , KBr, cm^{-1})

1728 ($\nu_{\text{C=O}}$ de éster); 1712 ($\nu_{\text{C=O}}$ de ácidos carboxílicos); 1519 (ν_{ass} NO₂ aromático); 1449 (δ_{CH_2} angular simétrica); 1348 (ν_{sim} NO₂ aromático e δ_{OH} angular).

4.14 ENSAIOS 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 o seu protótipo NF.

Os estudos de fotoestabilidade do NF e NFOH foram realizados no meio água/metanol (1:1, v/v). Primeiramente foi feita a análise de varredura dos compostos para a determinação do comprimento de onda máximo para os ensaios. Obtiveram-se os valores de 386 nm para o NF e 382 nm para o NFOH. A etapa seguinte foi a determinação da curva de calibração destes compostos nos valores de λ pré-determinados. A curva de calibração do NF pode ser visualizada no gráfico 1.

Gráfico 1: Curva de calibração NF.

Para o NFOH foram realizados os mesmos procedimentos e foi obtida a reta de calibração observada no gráfico 2.

Gráfico 2: Curva de calibração do NFOH.

Foram realizados os ensaios de fotodegradação do NF e NFOH, submetendo-os à exposição na luz durante 60 minutos e quantificando em intervalos apropriados de tempo. Os resultados podem ser observados à tabela X. A recuperação dos compostos foi quantificada com base nas curvas de calibração previamente construídas. Pode-se observar que os perfis de decomposição no UV do NF e NFOH são quase semelhantes (gráfico 3). Após 3 minutos de experimentos, houve a degradação de aproximadamente 20% dos compostos. Em 20 minutos, NF e NFOH apresentaram queda de 50% na concentração inicial. Além disso, percebe-se que o NFOH sofre um processo de decomposição ligeiramente maior, atingindo concentração de 2,8% de composto não-degradado após 60 minutos de experimento, comparado com 3,1% do NF. O mecanismo de fotodecomposição do nitrofural foi proposto por Quillian e colaboradores (1987) e pode ser visto na figura 33. Estes pesquisadores utilizaram HPLC acoplado à espectrometria de massas para identificar os produtos da fotodecomposição do NF (1), o isômero geométrico *sin* (2) e 5-nitro-2-furaldeído azina (3). Os resultados experimentais do composto 3 sugeriam a união de um grupo nitrofurano intacto na cadeia lateral por meio de dupla ligação.

FIGURA 33 – Mecanismo de fotodegradação do NF em UV (QUILLIAN *et al.*, 1987).

Tabela X: Quantidade de NF e NFOH recuperado utilizando espectrofotometria UV

Parâmetro	Quantidade recuperada (%)										
	Água/metanol 1:1 (v,v)										
Tempo (min)	0	3	5	10	15	20	25	30	40	50	60
NF											
Concentração (µg/mL)	10,0	7,9	7,6	6,9	6,1	5,5	5,0	4,5	4,0	3,5	3,1
Porcentagem (%)	100	80,4	76,3	65,7	57,0	50,2	43,8	39,1	32,8	29,5	27,7
NFOH											
Concentração (µg/mL)	10,0	8,0	7,8	6,7	5,8	5,1	4,5	4,0	3,3	3,0	2,8
Porcentagem (%)	100	78,8	73,3	69,1	62,0	55,5	50,2	45,6	39,4	34,8	31,8

UV: $\lambda=386$ nm NF; 382 nm NFOH.

Gráfico 3: Perfis de fotodegradação do NF e NFOH em espectrofotometria UV.

A figura 34 ilustra a mudança de espectros de absorção UV do NF, em água/metanol, 1:1, v/v. O composto foi submetido à exposição de 60 minutos (nos mesmos intervalos de tempo estabelecidos). Observaram-se dois máximos de absorção em 245 e 386 nm, que diminuíram rapidamente desde os primeiros 3 minutos de ensaio. Recuperaram-se 27,7% de fármaco ao final do experimento.

FIGURA 34 – Mudanças dos espectros de UV na fotodegradação do NF em água/metanol (1:1, v/v). Tempo: 60 minutos.

O NFOH apresentou um perfil semelhante de fotodegradação, observado na figura 35. Pode-se verificar 2 máximos de absorção em 263 e 382 nm. Assim como o NF, houve degradação do composto desde os 3 primeiros minutos de ensaio, atingindo 31,8% de fármaco recuperado ao final do experimento.

FIGURA 35 – Mudanças dos espectros de UV na fotodegradação do NFOH em água/metanol (1:1, v/v). Tempo: 60 minutos.

5 CONCLUSÕES

- O Planejamento fatorial 3^2 da síntese do NFOH foi utilizado para investigar a influência dos fatores tempo de reação e proporção NF:K₂CO₃ no resultado da reação. Verificou-se que o melhor rendimento (81,74%) ocorreu em 7 horas com a proporção NF: K₂CO₃, 1:1,5.
- Por meio da Modelagem Molecular observou-se que o método de síntese divergente seria o mais promissor para a obtenção dos pró-fármacos dendriméricos potencialmente antichagásicos propostos.
- A síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético (ácido málico protegido), intermediário na obtenção dos dendrímeros, foi obtida com êxito.
- As análises espectroscópicas do intermediário inositol e ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético sugeriram a obtenção do produto desejado, assim como o intermediário inositol e ácido L(-)-málico.
- As tentativas de esterificação do hidroximetilnitrofural, utilizando-se diferentes condições reacionais, incluindo o material nitro-heterocíclico – NFOH ou NF – não foram bem-sucedidas.
- Nas tentativas utilizadas para a obtenção do dendrímero de primeira geração, não se logrou êxito, o que pressupõe a necessidade de novos estudos, focalizando, sobretudo, a baixa reatividade do NFOH nessas reações.

Ensaio de fotoestabilidade do NF e NFOH foram complementares ao estudo proposto. Estes demonstraram a instabilidade destas moléculas frente à radiação UV. Estes resultados comprovaram a necessidade de cuidados especiais no manuseio destes compostos.

Embora não fizesse parte do presente estudo, foi efetuada síntese de dendrímero de primeira geração com outro protótipo, o cloranfenicol, para servir de base a patente, que está sendo pedida para dendrímeros em que o fármaco faz parte do *dendron*.

6 PERSPECTIVAS

- Tendo indícios da obtenção do produto de esterificação do NFOH, ao menos de acordo ao observado com o anidrido succínico, pretende-se aprimorar as rotas sintéticas para a gênese de pró-fármacos deste composto tão promissor ao combate à doença de Chagas.
- Aperfeiçoar metodologias de cromatografia de alta eficiência.
- Terminar os ensaios de fotoestabilidade do NF e NFOH.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M.V.; SILVA, A.D.; SOUZA, M.V.N.; BENÍCIO, A.A.A.A. Cascata dos fosfoinositídeos, *Química Nova*, v.26, p.105-111, 2003.
- ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; JONGH, D.C.; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N.A.; STEVENS, C.L. Reações de aldeídos e cetonas. In:_____. *Química Orgânica*. Rio de Janeiro: Editora JC, 1976, cap.18, p.427-476.
- ANDRADE, S.G.; ANDRADE, Z.A. Doença de Chagas e alterações neuronais no plexo de Aurbach. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.8, p.219-224, 1966.
- AUGUSTO, O; SCHREIBER, J.; MASON, R.P. Direct ESR detection of a free radical intermediate during the peroxidase - catalyzed oxidation of the antimalarial primaquine. *Biochemical Pharmacology*, v.37, p.2791-2797, 1988.
- BAARS, M. W. P. L.; MEIJER, E. W. Host-guest chemistry of dendritic molecules. *Topics in Current Chemistry*, v.210, p.131-182, 2000.
- BALLAUFF, M.; LIKOS, C.N. Dendrimers in solution: insight from theory and simulation, *Angewandte Chemie International Edition in English*, v.43, p.2998-3020, 2004.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. *Química Medicinal: as bases moleculares da terapêutica*. Porto Alegre: Artmed, 2001, p.178.
- 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.

- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como variar tudo ao mesmo tempo. In: _____. Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2ed, Campinas: Editora Unicamp, 2002, p. 83-100.
- BLANCA, M.; TORRES, M.J.; MAYORGA, C.; ROMANO, A.; PEREZ-INESTROSA, E.; SUAUA, R. *In vitro* methods for quantifying IgE antibodies to betalactams. *Allergy*, v.54, p.8-12, 1999.
- BOAS, U.; HEEGAARD, P.M.H. Dendrimers in drug research. *Chemical Society Reviews*, v.33, p.43-63, 2004.
- BODANSZKY, M.; BODANSZKY, A. Principles of peptide synthesis. Berlin: Springer-Verlag, 1984, 105-108p.
- BODOR, N.; FARAG, H.H.; BREWSTER, M.E. Site-specific, sustained release of drugs to the brain. *Science*, v.214, p.1370-1372, 1981.
- BOSKO, J.T.; TODD, B.D.; SADUS, R.J. Internal structure of dendrimers in the melt under shear: a molecular dynamics study. *Journal of Chemical Physics*, v.8, p.1091-1096, 2004.
- BOND, C.S.; ZHANG, Y.; BERRIMAN, M.; CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H.; HUNTER, W.N. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. *Structure*, v.7, p.81-89, 1999.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, v.27, p.347-382, 1973.

- BRENER, Z. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western Hemisphere. *Pharmacology and Therapeutics*, v.7, p.71-90, 1979.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL, M.N. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.41, p.44, p.381.
- BUNDGAARD, H. *Design of prodrugs*, Elsevier: Amsterdam, 1985.
- BURDEN, E.J.; RACETTE, E. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole, a new antimicrobial agent. IX. Action against hemoflagellate infections in laboratory animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.8, p.545-547, 1968.
- BUSCAGLIA, C.A.; NOIA, J.M.D. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas disease. *Microbes and Infection*, v.5, p.419-427, 2003.
- CAFFREY, C.R.; SCORY, S.; STEVERDING, D. Cysteine proteinases of trypanosome parasites: novel targets for chemotherapy. *Current Drug Targets*, v.1, p.155-162, 2000.
- 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.

- CARBONE, P.; CALABRETTA, A.; DI STEFANO M.; NEGRI, F.; MÜLLEN K. Shape persistence and bistability of planar three-fold core polyphenylene dendrimers: a molecular dynamics study. *Journal of Chemical Physics*, v.110, p.2214-2224, 2006.
- CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. *Química Nova*, v.26, p.428-438, 2003.
- CHAVES, F.; CALVO, J.C.; CARVAJAL, C.; RIVERA, Z.; RAMIREZ, L.; PINTO, M.; TRUJILLO, M.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M.E. Synthesis, isolation and characterization of *Plasmodium falciparum* antigenic tetrabranched peptide dendrímeros obtained by thiazolidine linkages. *Journal of Peptide Research*, v.58, p.307-316, 2001.
- CHAPADEIRO, E.; LOPES, E.R.; MESQUITA, P.M.; PEREIRA, F.E. Incidência de megas associados à cardiopatia chagásica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.6, p.287-296, 1964.
- CHUNG, M.C. *Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, p.135, 1996. [Tese de Doutorado].
- 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.; 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.
- CLONINGER, M.J. Biological applications of dendrímeros. *Chemistry and Biology*, v.6, p.742-748, 2002.
- 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.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, p.3-24, 2002.
- 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.
- 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.
- DEBNATH, A.K.; LOPEZ De COMPADRE, R.L.; DEBNATH, G.; SHUSTERMAN, A.J.; HANSCH, C. Structure-activity relationship of mutagenic aromatic and heteroaromatic nitro compounds. Correlation with molecular orbital energies and hydrophobicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.34, p.786, 1991.

- De CASTRO, S.L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, v.53, p.83-98, 1993.
- DEWAR, M.J.S.; ZOEBISCH, E.G.; STEWART, J.P.P. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *Journal of American Chemical Society*, v.107, p.3902-3907, 1985.
- DoCAMPO, R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmaceutical Design*, v.7, p.1157-1164, 2001.
- DOLPHIN, D.; POULSON, R.; AVRAMOVIC, O. *Glutathione; Chemical, Biochemical and Medical Aspects*. John Wiley & Sons, New York, USA, 1989.
- DORIGUETTO, A.C.; SILVA, C.H.T.P.; ELLENA, J.; TROSSINI, G.H.G.; CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. 5-Nitro-2-furaldehyde N-(hydroxymethyl)-semicarbazone. *Acta Crystallographica*, v.61, p.2099-2101, 2005.
- DUMAS, C.; OUELLETTE, M.; TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M.L.; FAIRLAMB, A.H.; TOMAR, S.; OLIVER, M.; PAPADOPOULOU, B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *The EMBO Journal*, v.16, p.2590-2598, 1997.
- EGMAN, D.M.; LEON, J.S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Tropica*, v.81, p.123-132, 2002.
- ELIEL, E.L.; WILEN, S.H.; DOYLE, M.P. In: ELIEL, E.L.; WILEN, S.H.; DOYLE, M.P., Eds. *Basic Organic Stereochemistry*. Canada: Wiley Interscience, 2001. p.421-463.
- EMANUELE, A.D.; ATTWOOD, D. Dendrimer–drug interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.57, p.2147-2162, 2005.

- EMANUELE, A.D.; ATTWOOD, D.; ABU-RMAILEH. In: SWARBRICK, J.C. *Dendrimer*. New York: Marcel Dekker, 2003, p. 1-21.
- 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.2393-2404, 2004.
- FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology*, v.46, p.695-729, 1992.
- FARIN, D.; AVNIR, D. Surface Fractality of Dendrimers. *Angewandte Chemie International Edition*, v.30, p.1379-1380, 2001.
- FISHER, M.; VÖGTLE, F. Dendrimers: from design to application: a progress report. *Angewandte Chemie International Edition*, v.38, p.884-905, 1999.
- FRANÇA, C.F.C. *Korolkovas Dicionário terapêutico Guanabara*, edição 2003/2004, São Paulo: Guanabara Koogan, 2004, p.18.7.
- 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.
- FURNISS, B.S.; HANNAFORD, A.J.; SMITH, P.W.G.; TATCHELL, A.R. *Vogel's Textbook of practical organic chemistry*. 5.ed, New York: Longman Scientific & Technical, 1989. 552p, 557p.

- GARCIA, E.S.; DVORAK, J.A. Growth and development of two *Trypanossoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.31, p.259-262, 1982.
- GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanossoma cruzi* within the insect vector. *Parasitology Today*, v.7, p.240-244, 1991.
- GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, 733p.
- GRAYSON, S.M.; FRÉCHET, J.M.J. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to application. *Chemical Reviews*, v.101, p.3819-3867, 2001.
- 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.
- HALGREN, T.A. Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries. *Journal of Computational Chemistry*, v.20, p.730-748, 1996.
- HAN, H.K.; AMIDON, G.L. Targeted prodrug design to optimize drug delivery. *AAPS PharmSciTech*, v.2, p.6, 2000.
- HANSCH, C.; SAMMES, P.G.; TAYLOR, J.B. *Quantitative drug design in comprehensive medicinal chemistry*. Eds, Oxford: Pergamon Press, 1990.

- 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.; FAIRLAMB, A.H.; ULRICH, P.; CERAMI, A. Substrate specificity of the flavoprotein trypanothione disulfide reductase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry*, v.26, p.3023-3027, 1987.
- 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.
- HEHRE, W.J. *A guide to molecular mechanics and quantum chemical calculations*. Irvine: Wavefunction Inc., 2003, p.271-292, p.393-407.
- 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.
- ICH, Photostability Testing of New Drug Substances and Products (Q1B). International Conference on Harmonization, IFPMA, Geneva, 1996.
- JANSEN, J.F.G.A.; De BRABANDER-Van Den BERG, E.M.M.; MEIJER, E.W. Encapsulation of guest molecules into a dendritic box. *Science*, v.266, p.1226-1229, 1994.

- KASAI, S.; NAGASAWA, H.; SHIMAMURA, M.; UTO, Y.; HORI, H. Design and synthesis of antiangiogenic heparin-binding arginina dendrimer mimicking the surface of endostatin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v.12, p.951-954, 2002.
- KLAJNERT, B.; BRYSEWSKA, M. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica*, v.48, p.199-208, 2001.
- KOBERLE F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American trypanosomiasis. *Advances in Parasitology*, v.6, p.63-73, 1968.
- KOBERLE, F.; NADOR, E. Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. *Revista Paulista de Medicina*, v.47, p.643-651, 1955.
- KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*. New York: Wiley-Interscience, 1988.
- LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NÓBREGA, M.D.; MIRANDA, A. Chagas Disease. A clinical, epidemiologic, and pathological study. *Circulation*, v.14, p.1035-1060, 1956.
- LA-SCALEA, M.A. Comportamento voltamétrico e mecanismo de ação biológica de nitroimidazóis. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.34, p.59-75, 1998.
- LEON, J.W.; KAWA, M.; FRÉCHET, J.M.J. Isophthalate ester-terminated dendrimers: versatile nanoscopic building blocks with readily modifiable surface functionalities. *Journal of the American Chemical Society*, v.118, p.8847-8859, 1996.
- LIU, M.; FRÉCHET, J.M.J. Designing dendrimers for drug delivery. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, v.2, p.393-401, 1999.

- LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BERNER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 344-378.
- MACEDO V. Forma indeterminada da doença de Chagas. *Jornal Brasileiro de Medicina*, v.38, p.34-40, 1980.
- 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.
- MARTON, L.J.; PEGG, A.E. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.35, p.55-91, 1995.
- 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.
- 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.
- McKERROW, J.H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. : *International Journal for Parasitology*, v.29, p.833-837, 1999.
- Mc WATT, 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: Academic Press, 1996. p. 11-24.
- MOREIRA, R.; MENDES, E.; CALHEIROS, T.; BACELO, M.J.; ILEY, J. A new direct synthesis of tertiary *N*-acyloxymethylamide prodrugs of carboxylic acid drugs. *Tetrahedron Letters*, v.35, p.7107-7110, 1994.
- MOREL, C.M. Reaching maturity – 25 Years of the TDR. *Parasitology Today*, v.16, p.522–525, 2000.
- NEVES, C.F.C.; SCHVARTZMAN, M.M.A.M. Técnicas para seleção de variáveis aplicadas à separação de gases. *Química Nova*, v.25, p.327-329, 2002.
- NEVES, D.P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. *Parasitologia Humana*, 10.ed, São Paulo: Atheneu, 2000, p. 73-96.
- OOYA, T.; LEE, J.; PARK, K. Effects of ethylene glycol-based graft, star-shaped, and dendritic polymers on solubilization and controlled release of paclitaxel. *Journal of Controlled Release*, v.93, p.121-127, 2003.
- PATRI, A.K.; MAJOROS, I.J.; BACKER, J.R.J. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.6, p.466-471, 2002.
- PATRICK, G. L. Computer in medicinal chemistry, In: _____. *An introduction to medicinal chemistry*. New York: Oxford, 2001, 319p, 370p, 2001.
- 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.
- PROKAI, L.; PROKAI-TATRAI, L.; BODOR, N. Targeting drugs to the brain by redox chemical delivery systems. *Medicinal Research Reviews*, v.20, p.367-416, 2000.
- QUILLIAN, M.A.; McCARRY, B.E.; HOO, K.H.; McCALLA, D.R.; VAITEKUNAS, S. Identification of the photolysis products of nitrofurazone. *Canadian Journal of Chemistry*, v.65, p.1128-1132, 1987.
- QIU, L.Y.; BAE, Y.H. Polymer Architecture and Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, v.23, p.1-30, 2005.
- RSBMT (REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL), Relatório Técnico, v.39, p.492-415, 2006.
- 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.
- REZENDE, J.M.; RASSI, A. Manifestações digestivas na fase aguda da doença de Chagas. In: RAIA, A.A., Ed. *Manifestações digestivas da moléstia de Chagas*. São Paulo: Sarvier-Editora de Livros Médicos, 1983, p.97-107.
- REZENDE, J.M.; RASSI, A. Comprometimento do esôfago na Moléstia de Chagas. *Hospital*, v.53, p.1-15, 1958.

- RIBEIRO, A.L.P.; ROCHA, M.O.C. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.31, p.301-314, 1998.
- RODRIGUEZ, J.B. Specific molecular targets to control tropical diseases. *Current Pharmaceutical Design*, v.7, p.1105-116, 2001.
- 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.
- SCHACHT, E.H.; VANSTEENKISTE, S.; SEYMOUR, L. Macromolecular carriers for drug targeting. In: WERMUTH, C. G., Ed. *The practice of Medicinal Chemistry*, London: Academic, 1996, p.717-736.
- 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.
- SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.C.; CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. Advances in prodrug design. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v.5, p.893-914, 2005.
- SILVA, 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.

- SINGH, G.; SHARMA, P.D. Mutual prodrugs – a recent trend in prodrug design. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.56, p.69-79, 1996.
- 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.
- STAAB, H.A.; MANNSCHRECK, A. Synthese von Carbonsäureestern der Imidazolidmethode. *Organisch Chemischen*, v.95, p.1284-1297, 1962.
- STERLING, J.; SLOVIN, E.; BARASCH, D. Use of acid malic as a chiral synthon: 24, 25 – Dihydroxycholecalciferol. *Tetrahedron Letters*. v.28, p.1685-1688, 1987.
- STOPPANI, A. O. M. Quimioterapia de la Enfermedad de Chagas. *Medicina*, v.59, p.147-165, 1999.
- TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Macromolecular drug carrier systems in cancer chemotherapy: macromolecular prodrugs. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v.18, p.207-231, 1995.
- TAKAKURA, Y.; MAHATO, R.I.; NISHIKAWA, M.; HASHIDA, M. Control of pharmacokinetic profiles of drug-macromolecule conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.19, p.377-399, 1996.
- TAM, J.P.; LU, Y.A.; YANG, J.L. Antimicrobial dendrimeric peptides. *European Journal of Biochemistry*, v.269, p.923-932, 2002.
- TARLETON, R.L.; SUN, J.; ZHANG, L.; POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation on myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infection and Immunity*, v.62, p.1820-1829, 1994.

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, v.29, p.338-350, 2006.

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.

THE MERCK INDEX .11.ed, Rahway: Merck & CO, Inc., 1989.

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.

TOURINHO, A.M.; ROCHA, N.V.P. Haloaquinações de compostos aromáticos-III. Cloro e bromometilação de éteres de fenol comum. *Anais da Associação Brasileira de Química*, v.26, p.19-22, 1967.

TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M.L.; SMITH, A.C.; CROFT, S.L.; FAIRLAMB, A.H. Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.95, p.5311-5316, 1998.

TOVAR, J.; WILKINSON, S.; MOTTRAM, J.C.; FAIRLAMB, A.H. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the *tryA* gene locus. *Molecular Microbiology*, v.29, p.653-660, 1998.

TROSSINI, G.H.G. Antichagásicos potenciais: Síntese de bases de Mannich do hidroximetilnitrofural. São Paulo, 2004 [Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].

- TROSSINI, G.H.G.; GIAROLLA, J.; REZENDE, L.; SANTOS, E.V.M.; FERREIRA, E. I. Planejamento fatorial 2^2 para otimização da síntese de hidroximetilnitrofural. In: X Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia, 2005, São Paulo. X Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia, 2005.
- TROSSINI, G.H.G.; GIAROLLA, J.; REZENDE, L.; DO-AMARAL, A.T.; ZAIM, M.H.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, E.I. Synthesis optimization of hydroxymethylnitrofurazone, a potential antichagasic candidate, using 3^2 factorial design. *Synthetic Communications*, 2007 (submetido).
- UMEZAWA, E.S.; NASCIMENTO, M.S.; KESPER, N.J.R.; COURA, J.R.; PEREIRA, J.B.; JUNQUEIRA, A.C.V.; CAMARGO, M.E. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, p.2143-2147, 1996.
- 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 treatment of Chagas disease: current status and new developments. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.14, p.733-741, 2001.
- URBINA, J.A. Chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmaceutical Design*, v.8, p.287-295, 2002.
- URBINA, J.A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversis and advances. *Trends in Parasitology*, v.19, p.495-501, 2003.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*. 2.ed., São Paulo: Atheneu, 2004, 1198p.

VINHAES, M.C.; SCHOFIELD, C.J. Trypanosomiasis control: surmounting diminishing returns. *Trends in Parasitology*, v.19, p.112–113, 2003.

WEISS, M.E.; ADIKSON, N.F. Immediate hypersensitivity reactions to penicillins related antibiotics. *Clinical Allergy*, v.18, p.515-540, 1988.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: JOLLE, G., WOOLDRIGE, K.R.M. *Drug Design: fact or fantasy?* London: Academic Press, 1984. p.47-72.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: _____ *The practice of Medicinal Chemistry*. London: Academic Press, 2003. p.697-716.

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.

ZENG, F.; ZIMMERMAN, S.C. Dendrimers in supramolecular chemistry: from molecular recognition to self-assembly. *Journal of the American Chemical Society*, v.97, p.1681-1712, 1997.

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.

A.1 ATIVIDADES CIENTÍFICAS

1. Trossini, G.H.G.; Giarolla, J.; Rezende, L.; Santos, E.V.M.; Ferreira, E. I. Planejamento fatorial 2^2 para otimização da síntese de hidroximetilnitrofurais. In: X Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia, 2005, São Paulo. X Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia, 2005.
2. Giarolla, J.; Trossini, G.H.G.; Zaim, M.H.; Ferreira, E.I.; Menezes, C.M.S. Utilização da modelagem molecular para a escolha do método de síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente antichagásicos. Sociedade Brasileira de Química, 29ª Reunião Anual, Águas de Lindóia, Maio, 2006.
3. Andrade, C.H.; Trossini, G.H.G.; Otelo, V.A.; Giarolla, J.; Botelho, K.C.A.; Matsutami, G.C.; Pancote, C.G.; Ferreira, E.I.; Menezes, C.M.S. Aplicação da Modelagem Molecular no ensino de Química Farmacêutica. Sociedade Brasileira de Química, 29ª Reunião Anual, Águas de Lindóia, Maio, 2006.
4. Andrade, C.H.; Trossini, G.H.G.; Otelo, V.A.; Giarolla, J.; Botelho, K.C.A.; Pancote, C.G.; Ferreira, E.I.; Menezes, C.M.S. Molecular Modeling on Medicinal Chemistry Education. International Symposium on Drug Discovery and IX National Meeting of Medicinal Chemistry Professors. Araraquara, July, 2006.
5. Giarolla, J.; Zaim, M.H.; Ferreira, E.I.; Menezes, C.M.S. Modelagem molecular no planejamento sintético de pró-fármacos dendriméricos potencialmente antichagásicos. XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, 2006.
6. Giarolla, J.; Zaim, M.H.; Ferreira, E.I.; Menezes, C.M.S. Molecular Modeling in the Synthetic Design of Potential Antichagasic Dendrimer Prodrugs. The 3rd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry-BrazMedChem, 2006.

7. Pereira, L.R.; Grallert, S.R.M.; Santos, M.G.B.; Giarolla, J.; Tavares, L.C. Síntese, estudos de modelagem molecular e avaliação da atividade anti-estafilocócica de flavonóides. XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, 2006.
8. Ferreira, E.I.; Giarolla, J. Submissão da patente para Agência USP de Inovação: Pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos, 2007.
9. Trossini, G.H.G.; Giarolla, J.; Rezende, I.; Do-Amaral, A.T.; Zaim, M.H.; Bruns, R.E.; Ferreira, E.I. Synthesis optimization of hydroxymethylnitrofurazone, a potential antichagasic candidate, using 3^2 factorial design. *Synthetic Communications*, 2007 (submetido).

Premiação

Giarolla, J.; Zaim, M.H.; Ferreira, E.I.; Menezes, C.M.S. Melhor trabalho de pós-graduação da Universidade de São Paulo. Apresentação Oral. Título: "Modelagem molecular no planejamento sintético de pró-fármacos dendriméricos potencialmente antichagásicos". XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, 2006.