UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACO E MEDICAMENTOS
ÁREA DE INSUMOS FARMACÊUTICOS
Departamento de Farmácia

**PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS POTENCIALMENTE ATIVOS EM
MALÁRIA E TUBERCULOSE: SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

DIEGO CAMPOS PRIETO

Dissertação para obtenção do título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. JEANINE GIAROLLA VARGAS

São Paulo
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACO E MEDICAMENTOS
ÁREA DE INSUMOS FARMACÊUTICOS
Departamento de Farmácia

**PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS POTENCIALMENTE ATIVOS EM
MALÁRIA E TUBERCULOSE: SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

DIEGO CAMPOS PRIETO

Versão Original

Dissertação para obtenção do título de Mestre
Orientadora: Profa. Dra. JEANINE GIAROLLA VARGAS

São Paulo
2020

DIEGO CAMPOS PRIETO

**PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS POTENCIALMENTE ATIVOS EM
MALÁRIA E TUBERCULOSE: SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Profa. Dra. Jeanine Giarolla Vargas
orientadora/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2020.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:

Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P949p Prieto, Diego
Pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos
contra malária e tuberculose: Síntese e avaliação da
atividade biológica / Diego Prieto. - São Paulo,
2020.
134 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Giarolla, Jeanine

1. Dendrimeros. 2. Doenças Negligneciadas. 3.
Malária. 4. Tuberculose. 5. Pró-fármacos. I. T. II.
Giarolla, Jeanine, orientador.

"I wish it need not have happened in my time," said Frodo.

*"So do I," said Gandalf, "and so do all who live to see such times. But that is not for them to decide. All we have to decide is what to do with the time that is given us." J.R.R. Tolkien –
The Fellowship of The Ring*

*Aos colegas cientistas e a todos que, por mais obscuros que sejam os tempos,
tentam levar a luz do conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos que vieram antes. Conhecimento não é pontual, é uma construção, logo esse trabalho só foi possível devido a conhecimentos criados e sedimentados por mulheres e homens que dedicaram a sua vida a ciência.

Agradeço também a minha família: Meus pais, Rosana e Carlos por todo o apoio e dedicação a minha educação e a minha formação como homem e cidadão. As minhas avós que me ensinam que conhecimento não vem só da academia. A minha madrastra Mirla pelos debates, ao meu padrasto Danilo pelas longas conversas sobre qualquer (qualquer mesmo) assunto. Aos meus tios, Angélica e Betinho e aos meus primos Victor, Vini e Laís. E ao meu irmão Gubs, por me ensinar que carinho e afeto independem de frases.

Á Natassja, a pessoa mais responsável e atenciosa que eu conheço. Obrigado pela companhia em todos os momentos, das viagens mais incríveis ao momentos de ansiedade. E por acreditar em mim, mesmo quando eu não acredito.

Á Professora Jeanine, como exemplo de orientadora, por me deixar criar, ter ideias e principalmente por apoiá-las e incentivá-las. Tenho muita sorte de ser seu orientado. Á professora Beth, pelo imenso conhecimento e por todos os ensinamentos.

Aos colegas de LAPEN recentes e passados: Rodrigo, João, Bruna, Soraya, Luccas, Fi, Lucas, Débora, Charles, Gabriel, Mônica, Ricardo, Marina e tantos outros que estão e que passaram por lá e dividiram não só o espaço, mas seus conhecimentos, vivências e compartilharam a angústia da vida de pósgraduação.

Aos colegas de outros laboratórios, começando pelo Professor Roberto Parise, meu primeiro orientador de IC e que teve uma contruição enorme por ajudar a despertar em mim o amor pela ciência. A Rose com quem eu trabalhei na minha primeira IC, a Thais, Maurício, Fernando, Alfredo, Gustavo e vários outros.

To all the colleagues in the University of Groningen, starting with Professor Matthew Groves for receiving me so kindly on his lab. To Rick Oerlemans, not only for the friendship, but also for teaching of his incredible knowledge about most everything. I also would like to thank Juliana, Fernando, Maiara, Kai and Fabiola for receiving me and making me feel at home in Groningen.

Aos professores que de alguma forma contribuíram com esse projeto: Professor Scott Grayson pelos dendrímeros, Professor Jonas Gruber pelas dicas e contatos na central analítica.

Aos alunos de IC que estiveram comigo ajudando a fazer desse trabalho o mais completo possível: Helena, Sophia, Célia, José Carlos e Sara. Um agradecimento especial ao Renan (Guaru) pelos conhecimentos, discussões e compartilhamento de memes.

Ao Farma Roots, meus amigos queridos desde os tempos de graduação: Laila, Thamy, Nina, Zé, Raul, Dragunas, Chinelo e Erika pelos anos de amizade, bares do Tutu, cervejas, churrascos, festas e viagens. Agradecer por aguentarem a minha chatice nesses últimos 9 anos.

Em especial, gostaria de agradecer ao Nuno, um também farma roots, mas que esteve ao meu lado durante a pós. Obrigado de coração pelas conversas, desabafos, idéias mirabolantes de síntese, por colocar fogo nas coisas e fazer desses dois anos e meio de mestrado MUITO mais divertidos.

Aos amigos da Farmatuque, do Pharmaceltics, a Thaina, o Witor, o Arthur, e aos amigos de longa data de Escola da Vila: Mari, Isa, Fê, Eric e outros.

Aos funcionários Kelma, David, Alexandre. E a Dora pelo seu papel fundamental em manter a produtividade do departamento com o seus cafés.

Por último, gostaria de agradecer a CNPq pela bolsa de mestrado e a Erasmus pela bolsa de intercâmbio.

RESUMO

PRIETO, D.C. **Pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos em malária e tuberculose: síntese e avaliação da atividade biológica.** 2020. 134p. Tese (Mestrado) – Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

HIV/AIDS, tuberculose, malária e as doenças tropicais negligenciadas representam uma grande preocupação em Saúde em muitas regiões do mundo. Os fármacos disponíveis para o tratamento apresentam diversos problemas, tais como toxicidade e resistência ao parasita. Mesmo com esse triste panorama, o investimento em pesquisa nessa área é, ainda, pouco significativo. Assim, dentre os métodos de modificação molecular para melhorar propriedades farmacêuticas, farmacocinéticas e/ou farmacodinâmica de compostos bioativos destaca-se a latenciação. Já os dendrímeros vêm despertando interesse em aplicações biológicas, principalmente como transportadores de fármacos, além de atuarem como transportadores de genes, imagem em diagnóstico e compostos com ação *per se*. Face ao exposto e tendo em vista o caráter promissor dos dendrímeros como sistemas de *drug delivery*, o objetivo deste trabalho foi a síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos em malária e tuberculose. Os dendrímeros de Bis-MPA (gerações 0, 1 e 2) foram sintetizados pelo grupo do Professor Scott Grayson, da *Tulane University* (EUA). No Brasil, foram feitas as funcionalizações destes compostos, através do acoplamento do ácido succínico (que funciona como espaçante) e as moléculas ativas. Selecionaram-se as seguintes substâncias: **(1)** primaquina, com ação antimalárica e **(2)** isoniazida, de ação nos primeiros estágios da tuberculose. Foram sintetizados os pró-fármacos dendriméricos de isoniazida nas gerações 0 e 1 (G0-Iso e G1-Iso), e primaquina nas gerações 0, 1 e 2 (G0-Pq, G1-Pq e G2Pq). Importante mencionar que os resultados de Ressonância Magnética e Nuclear de ^1H e de ^{13}C demonstraram as obtenções dos respectivos produtos, porém contendo impurezas. Já a análise do resultado proveniente da espectrometria de massas do composto G0-Iso revelou a presença de um subproduto ciclizado da isoniazida succinilada (CIso-Suc), o qual pode ser um potencial pró-fármaco ou apresentar atividade *per se*. Como não se conhece este composto, o laboratório coordenado pela Profas Elizabeth Igne Ferreira e Jeanine Giarolla manifestou interesse em pesquisa-lo, principalmente quanto suas propriedades físico- químicas, bem como quanto à atividade biológica.

Assim, utilizando metodologia analítica previamente estabelecida para o G0-Iso, os estudos de estabilidade química da Clso-Suc, em diferentes valores de pH, demonstraram a capacidade da forma ciclizada em se converter no protótipo Iso-Suc, majoritariamente em pH 7,4 e 8,5. Como perspectivas, destaca-se a avaliação da estabilidade enzimática deste potencial derivado. Ressalta-se, ainda, a a avaliação da respectiva atividade antimicobacteriana. Em relação aos pró-fármacos, as necessidades de aprimoramentos das sínteses são, também, evidenciadas. Uma vez sintetizados e caracterizados, estes últimos derivados serão avaliados quanto à atividade biológica. Ademais, estudos computacionais, sobretudo simulações de *docking* molecular, foram desenvolvidos com intuito de se entender o modo de interação de alguns compostos com alvos biológicos pré-determinados.

Palavras-chave: pró-fármacos, dendrímeros de Bis-MPA, malária, tuberculose.

ABSTRACT

PRIETO, D.C. **Dendrimeric prodrugs potentially active in malaria and tuberculosis: Synthesis and evaluation of biological activity.** 2020. 134p. Tese (Mestrado) – Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

HIV/AIDS, tuberculosis, malaria and neglected diseases are a major health concern in many regions of the world. The drugs available present various problems, such as toxicity and parasite resistance. Even with this sad outlook, research investment in this area is still insignificant. Among the molecular modification methods to improve the pharmaceutical, pharmacokinetic and/or pharmacodynamic properties we stands out prodrug design. On the other hand, dendrimers are arousing interest in biological applications, mainly as drug carriers, besides gene delivery, diagnostic imaging, as well as acting as compounds with activity *per se*. Considering that, added to the promising dendrimer drug delivery features, the aim of this study was to synthesize potentially active dendrimer prodrugs in malaria and tuberculosis. Bis-MPA dendrimers (generations 0, 1 and 2) were synthesized by the group of Professor Scott Grayson of Tulane University (USA). Herein in Brazil, the compounds were functionalized by coupling succinic acid (spacer group), as well as the active molecules. We selected the following substances: **(1)** primaquine, with antimalarial action and **(2)** isoniazid, acting in the early stages of tuberculosis. Isoniazid dendrimer prodrugs were synthesized generations 0 and 1 (G0-Iso and G1-Iso), and primaquine in generations 0, 1 and 2 (G0-Pq, G1-Pq and G2-Pq). It is important to mention that the results related to Nuclear and Magnetic Resonance ^1H and ^{13}C showed chemical structures features, however with impurities. Analysis of the mass spectrometry regarding G0-Iso has revealed the presence of a cyclized by-product of succinylated isonized (CIso-Suc), which may be a potential prodrug or may present activity itself. Using the analytical methodology performed for G0-Iso, ICso-Suc demonstrated its ability to convert the Iso-Suc prototype at different pH values, especially at pH 7.4 and 8.5. As perspectives, we highlight the determinations of the chemical stability of ICsoSuc at pH 1.5 and 6.0, as well as the evaluation of the enzymatic stability. We will also investigate the respective antimicrobial activities. Regarding prodrugs, the needs for synthesis enhancements are also necessary. Once synthesized and characterized, these latter derivatives will be evaluated for biological activity. Moreover, computational studies, especially molecular docking simulations, were developed in order to understand the mode of interaction of some compounds with predetermined biological targets.

Key-words: Prodrug design, Bis-MPA dendrimers, malaria, tuberculosis.

SUMÁRIO GERAL

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. MATERIAL	26
3.1.1. Reagentes e solventes	26
3.1.2. Equipamentos	26
3.1.3. Programas computacionais	27
3.2. MÉTODOS SINTÉTICOS	27
3.2.1. Síntese do pró-fármaco succinilado de isoniazida (Iso-Suc)	27
(FENG et al, 2002)	27
3.2.2. Síntese do pró-fármaco succinilado de primaquina (Pq-Suc)	27
(FENG et al, 2002)	27
3.2.3. Formação de cloreto de ácido de isoniazida <i>in situ</i> e posterior reação com dendrímero geração 0 (G0-Iso) (CHAUDHARI, AKAMANCHI, 28	28
1999)	28
3.2.4. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de G0 contendo isoniazida	29
(G0-Iso) (MOONEY et al, 2010)	29
3.2.5. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de G0 contendo primaquina	29
.....	29
(G0-Pq) (MOONEY et al, 2010)	29
3.2.6. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de G1 contendo isoniazida	30
(G1-Iso) (MOONEY et al, 2010)	30
3.2.7. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de G1 contendo primaquina	31
.....	31
(G1-Pq) (MOONEY et al, 2010)	31
3.2.8. Síntese do pró-fármaco Clso-Suc.....	32
3.3. ESTUDOS DE ESTABILIDADE QUÍMICA DE Clso-Suc (NAJLAH et al,	32
2006)	32
3.3.1. Desenvolvimento do método analítico	33

3.3.2. Estudo de estabilidade química	33
3.4. Estudos <i>in silico</i>	35
3.4.1. Simulações de <i>docking</i> molecular entre os pró-fármacos dendriméricos e esterase inespecífica	35
3.4.2. Simulações de <i>docking</i> molecular entre a Clso-Suc e a catalase- . 37 peroxidase	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. METODOLOGIA SINTÉTICA	38
4.1.1. Síntese dos derivados succinilados de isoniazida e de primaquina (Iso-Suc e Iso-Pq)	38
4.1.2. Síntese dos pró-fármacos dendriméricos de geração 0 (G0-Iso e G0-Pq)	43
4.1.3. Síntese dos pró-fármacos dendriméricos de geração 1 (G1-Iso e G1-Pq)	59
4.2. ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	66
4.2.1. Simulações de <i>docking</i> molecular entre os pró-fármacos 66 dendriméricos e esterase inespecífica	66
4.2.2. Re- <i>docking</i> no programa GOLD (Verdonk et al, 2003)	67
4.2.3. Resultados de <i>docking</i> no programa GOLD (Verdonk et al, 2003).....	69
4.2.4. G0-Iso	71
4.2.5. G1-Iso	73
4.2.6. G0-Pq	75
4.2.7. G1-Pq	76
4.2.8. Resultados AutoDock (Trott et al., 2010)	78
4.2.9. Simulações de <i>docking</i> molecular entre a Clso-Suc e a catalase- . 79 peroxidase	79
4.3. ESTUDOS DE ESTABILIDADE QUÍMICA DA Clso-Suc (NAJLAH et al, 2006)	86

4.3.1. Desenvolvimento do método analítico	86
4.3.2. Estudos de estabilidade química	89
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	100
6. REFERÊNCIAS	101
ANEXOS	111

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1. Incidência global de tuberculose para cada 100 mil habitantes em 2018 (WHO, 2019).	19
Figura 2. Incidência global de malária em 2017 (WHO, 2018).	19
Figura 3. Principais métodos de síntese dos dendrímeros: convergente e divergente (traduzido de SATIJA et al., 2011).	23
Figura 4. Pró-fármaco dendrimérico potencialmente ativo em tuberculose contendo isoniazida. Fez-se esta representação esquemática com o dendrímero de geração 0.	24
Figura 5. Representação esquemática do Clso-Suc.	25
Figura 6. Síntese da Iso-suc.	26
Figura 7. Síntese da Pq-suc.	27
Figura 8. Esquema 1. Formação do cloreto de ácido de Iso-Suc. Esquema 2. reação de acoplamento do derivado cloreto de ácido da Iso-Suc com o G0. ..	27
Figura 9. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de isoniazida geração 0 (G0-Iso).	28
Figura 10. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de primaquina geração 0 (G0-Pq).	29
Figura 11. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de isoniazida geração 1 (G1-Iso).	30
Figura 12. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de primaquina geração 1 (G1-Pq).	31
Figura 13. Síntese do pró-fármaco ciclizado de isoniazida (Clso-Suc).	31
Figura 14. Mecanismo de reação das reações com o agente condensante DCC (NEISES et al, 1979).	43
Figura 15. Mecanismo de reação de formação de cloreto de ácido utilizando cloreto de oxalila (CHAUDHARI, AKAMANCHI, 1999)	45
Figura 16. Esquema simplificado da transformação de EDC em EDU nas reações de esterificação.	45
Figura 17. LC-MS de G0-Iso impuro. Condições de análise: Condições de análise no LC: solvente A (0,1% Ácido Fórmico/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Condições de análise no MS: voltagem no capilar (4500 V) e temperatura (325 °C), 20 µL de amostra.	53
Figura 18. Composto do pico majoritário do LC-MS .Condições de análise: Condições de análise no LC: solvente A (0,1% Ácido Fórmico/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B.	

Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Condições de análise no MS: voltagem no capilar (4500 V) e temperatura (325 °C), 20 L de amostra.

.....	54
Figura 19. Estruturas químicas e algumas das propriedades da Clso-Suc de 6 e 5 membros.	54
Figura 20. LogP da Clso-Suc de 6 membros (esquerda) e 5 membros (direita).	55
Figura 21. Mecanismo proposto de formação da Clso-Suc.	55
Figura 22. Dendrímero de Bis-MPA de geração 1.	59
Figura 23. Pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos em malária ou tuberculose. Representaram-se as gerações 0 (esquema 1) e 1 (esquema 2). Destacaram-se nos quadrados: a) isoniazida succinilada e b) primaquina succinilada. As carbonilas de interesse estão realçadas em vermelho e verde na figura.	66
Figura 24. Confômero 4 do re-docking do ligante na enzima 2H7C.	67
Figura 25. Mecanismo geral da catálise da serinoprotease (HEDSTROM, 2002).	69
Figura 26. Confômeros 24 (esquerda) e 10 (direita) resultantes das simulações de docking da G0-Iso na enzima 2H7C. As distâncias entre a Serina 221 e as carbonilas C2 estão destacadas em vermelho.	71
Figura 27. Confômero 17 resultante das simulações de docking da G1-Iso na enzima 2H7C. A distância entre a Serina 221 e C1 está destacada em vermelho.	72
Figura 28. Confômeros 7 (esquerda) e 2 resultantes das simulações de docking da G1-Iso na enzima 2H7C. As distâncias entre a Serina 221 e C1 estão destacadas em vermelho.	73
Figura 29. Dock (número 2) da isoniazida na enzima PDB 1SJ2.	82
Figura 31. Dock (número 17) da Iso_Cic5 na enzima 1SJ2.	83
Figura 30. Dock (número 17) da Iso_Cic6 na enzima 1SJ2.	83
Figura 32. Gráfico da variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em solução tampão pH 1,2.	89
Figura 33. Gráfico da variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em solução tampão pH 6,0.	90
Figura 34. Gráfico da variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em solução tampão pH 7,4.	95
Figura 35. Gráfico da variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em solução tampão pH 8,5.	96
Figura 36. Estruturas da Clso-Suc (esquerda) e Iso-Suc (direita).	99

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1. Metodologia farmacopeica e System Suitability para análise

cromatográfica de isoniazida	32
Tabela 2. Parâmetros analíticos para o ensaio de liberação	33
Tabela 3. Relação entre o número da amostra e o tempo de coleta.	34
Tabela 5. Resultados obtidos no re-docking realizados programa GOLD (Verdonk et al, 2003)	68
Tabela 6. Melhor pose obtida no re-docking com o programa GOLD e confirmação do RMSd	69
Tabela 7. Resultados dos 30 confôrmeros obtidos pelo docking da G0-Iso, G1Iso, G0-Pq e G1-Pq no programa GOLD (Verdonk et al, 2003).	70
Tabela 8. Melhores resultados de docking da G0-Iso na enzima 2H7C. C1 e C2 estão destacadas em vermelho na estrutura.....	71
Tabela 9. Resultados obtidos pelo docking da G1-Iso no programa GOLD (Verdonk et al, 2003). As carbonilas C1 e C2 estão destacadas em vermelho.	73
Tabela 10. Resultados obtidos pelo docking da G0-primaquina no programa GOLD (Verdonk et al, 2003)	74
Tabela 11. Resultados obtidos pelo docking da G1-Pq no programa GOLD (Verdonk et al, 2003)	75
Tabela 12. Resultados das simulações de docking resultantes do programa AutoDock (Trott et al., 2010).	76
Tabela 13. Resultados obtidos no programa Gold (Verdonk et al, 2003) para as funções de scores ChemScore e ASP e as distâncias médias (em Å) entre os ligantes e o ferro do grupo heme.	78
Tabela 14. Distância média das estruturas em relação ao ferro do grupo heme (em Å).	78
Tabela 15. Principais aminoácidos envolvidos nas interação de Iso_Cic5 e Iso_Cic6 com o alvo molecular, comparados com a isoniazida.	80
Tabela 16. Comparação entre quantidade de interações das estruturas com os aminoácidos.	81
Tabela 17. Colunas cromatográficas testadas.	84
Tabela 18. Determinação da proporção entre os solventes tampão fosfato e metanol.	86
Tabela 19. Gradiente de fluxo escolhido.	87
Tabela 20. Comparação entre o fluxo constante e o gradiente de fluxo.	87
Tabela 21. Média das áreas de Clso-suc e Iso-suc ao longo do ensaio em solução tampão pH 1,2.	89
Tabela 22. Média das áreas de Clso-suc e Iso-suc ao longo do ensaio em solução tampão pH 6,0.	90
Tabela 23. Média das áreas de Clso-suc e Iso-Suc ao longo do ensaio em pH 7,4.	94
Tabela 24. Média das áreas de Clso-suc e Iso-Suc ao longo do ensaio em pH 8,5.	95

SUMÁRIO DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN de ¹ H da Iso-Suc.	38
Espectro 2. RMN de ¹³ C da Iso-Suc.	39
Espectro 3. Espectro no IV (λ, KBr, cm ⁻¹) da Iso-Suc.	40
Espectro 4. RMN de ¹ H do produto Pq-Suc.....	41
Espectro 5. RMN de ¹³ C do produto Pq-Suc.	42
Espectro 6. RMN de ¹ H do produto G0-Pq. Observam-se os sinais característicos do DCU na região entre 1-1,5 ppm.	44
Espectro 7. Espectro de RMN de ¹ H do produto G0-Pq.	47
Espectro 8. RMN de ¹³ C do produto G0-Pq.	48
Espectro 9. Espectro no infravermelho do produto G0-Pq.	49
Espectro 10. RMN de ¹ H do produto G0-Iso.....	50
Espectro 11. RMN de ¹³ C do produto G0-Iso.	51
Espectro 12. Espectro no infravermelho do produto G0-Iso.....	52
Espectro 13. Espectro de ¹ H RMN do produto C Iso-Suc	57
Espectro 14. Espectro de ¹³ C RMN do produto C Iso-Suc.	58
Espectro 15. RMN de ¹ H do produto G1-Iso.....	60
Espectro 16. RMN de ¹³ C do produto G1-Iso.	61
Espectro 17. RMN de ¹ H do produto G1-Pq.	63
Espectro 18. RMN de ¹³ C do produto G1-Pq.	65

SUMÁRIO DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 1,2 (T0). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.	91
Cromatograma 3. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 6,0 (T0). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.	92
Cromatograma 2. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 1,2 (T13). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.	92
Cromatograma 4. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 6,0 (T13). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.	93
Cromatograma 5. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH	

7,4 (T0). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm. 97

Cromatograma 7. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 8,5 (T0). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm. 98

Cromatograma 6. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 7,4 (T13). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm. 97

Cromatograma 8. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 8,5 (T13). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm. 98

1. INTRODUÇÃO

Malária, HIV/AIDS e tuberculose fazem parte do grupo conhecido como “três grandes” doenças por causarem efeitos devastadores em países pobres, especialmente na África. Juntas foram responsáveis por mais de cinco milhões de mortes em 2007, o equivalente a 39% das mortes por doenças infecciosas (KEALEY, SMITH, 2010). Apesar de terem números de mortalidades extremamente elevados, as “três grandes” não são consideradas negligenciadas. Estas infecções contam com fundos humanitários de doação de investimentos, captando a maioria do aporte financeiro em pesquisas (MORAN et al., 2009; GREENALL et al., 2017). Assim, possuem maiores incentivos monetários em relação às outras classificadas como negligenciadas, por exemplo, a esquistossomose e a doença de Chagas (MORAN et al., 2009).

Segundo dados dos relatórios anuais da Organização Mundial da Saúde (OMS) a prevalência de tuberculose em 2018 foi entre 9,9 e 11,1 milhões de pessoas no mundo, com uma incidência média de 132/100 mil habitantes. Apesar de ter casos relatados na Europa e na América do Norte, a maioria foi reportada no sudeste asiático (44%) e África (24%), aproximando, epidemiologicamente, a tuberculose das doenças negligenciadas. A **Figura 1** ilustra a incidência global de tuberculose no ano de 2018. No mesmo ano, a OMS registrou uma mortalidade estimada de 1,2 milhões de pessoas por tuberculose em pacientes HIV-negativo (intervalo entre 1,1 e 1,3 milhões). Desse número de mortes, 82% aconteceram nas mesmas regiões onde a incidência é maior, ou seja, o sudeste asiático e a África (WHO, 2019), locais que, também, concentram as maiores taxas de tuberculose entre pacientes HIV-positivo.

Figura 1. Incidência global de tuberculose para cada 100 mil habitantes em 2018 (WHO, 2019).

Já para a malária, foi registrado uma incidência de 219 milhões de casos em 2017, com mortalidade de 435 mil pessoas (WHO, 2017). As regiões endêmicas incluem parte da América do Sul, da América Central, grande parte da África, da Ásia e da Oceania (WHO, 2017). Como mostra a **Figura 2**, a doença acomete, principalmente, regiões tropicais, onde o vetor, o mosquito *Anopheles*, é mais frequentemente encontrado.

Figura 2. Incidência global de malária em 2017 (WHO, 2018).

Os poucos compostos disponíveis da terapêutica para estas infecções apresentam problemas farmacocinéticos, são tóxicos, pouco atrativos para a aderência pelo paciente e existem relatos de resistência (RENSLO; MCKERROW, 2006; ABDULLA et al., 2009; CROFT, 2016).

O desenvolvimento de novos fármacos, por sua vez, é um processo extremamente complexo e caro. A busca de um líder, ou seja, uma molécula com potencialidade para se tornar um fármaco, é demorada. Primeiramente, é necessário determinar o tipo de estratégia de planejamento a ser utilizada, a baseada no alvo, chamada de *Structure Based Drug Design* (SBDD), ou no ligante *Ligand Based Drug Design* (LBDD) (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). Aproximadamente 70% de compostos líderes falham nas primeiras etapas de ensaios pré-clínicos, devido, principalmente, a toxicidade e problemas farmacocinéticos (FAKUNLE; LORING, 2012). Neste sentido, métodos de modificações moleculares podem úteis. Dentre estes métodos, destaca-se a latenciação, que foi proposta por Harpper em 1959 (CHUNG et al., 2005). Neste processo, a molécula é transformada em sua forma inativa de transporte, denominada pró-fármaco que, *in vivo*, é biotransformada em sua forma ativa. Simplificadamente, os pró-fármacos podem ser divididos em duas classes, os que estão ligados a transportadores e os bioprecursores. Na primeira classificação, a síntese pode ser feita reagindo o composto ativo com um transportador, através de uma ligação lábil. O ideal é que os experimentos sejam fáceis e baratos. Éster é o grupo funcional mais utilizado na obtenção de prófármacos, por ser facilmente hidrolisado por esterases plasmáticas. Dentre as características importantes do transportador têm-se: não ser imunogênico, deve ser estável e, quando desligado da forma ativa, não deve gerar metabólitos tóxicos. Já os bioprecursores necessitam ser metabolizados para terem ação biológica (CHUNG et al, 2005; SILVA et al., 2005; ZAWILSKA, WOJCIESZAK, OLEJNICZAK, 2013, HAMADA, 2017).

Como mencionado anteriormente, para que o fármaco/compostos ativo tenha ação é necessário que haja a liberação do transportador. Assim, a predição deste comportamento farmacocinético é de suma importância no desenvolvimento pré-clínico da forma latente. A hidrólise ácida ou básica, a qual pode acontecer durante o trânsito no trato gastro-intestinal, pode ser responsável pela desmontagem do pró-fármaco. Já a liberação do componente ativo por ação

enzimática pode ocorrer pela ação de esterases e fosfatases plasmáticas. Assim, em estudos de estabilidades químicas, é importante que se escolha o pH apropriado, o qual simula a condição fisiológica (RAUTIO et al, 2008).

O planejamento de pró-fármacos almeja três objetivos principais, os quais estão relacionados: **(1)** na fase farmacêutica, a forma latente pode melhorar solubilidade, estabilidade química, propriedades organolépticas, entre outras; **(2)** na fase farmacocinética, pode interferir, por exemplo, na absorção, meia-vida e metabolismo de primeira passagem e **(3)** na fase farmacodinâmica o pró-fármaco pode aprimorar, de modo indireto, a interação do composto ativo com o alvo molecular (MORI et al., 2017).

Na última década, os dendrímeros vêm despertando interesse em diversas aplicações biológicas, por exemplo, como transportadores de fármacos, transportadores de genes, imagem em diagnóstico e compostos com ação por se (DIAS, A.P et al, 2020; ARAUJO, R.V et al, 2018). Segundo definição de Cheng e colaboradores (2008), dendrímeros são macromoléculas artificiais parecidas com árvores, com muitas ramificações, tamanho nanoscópico, as quais ocupam o mesmo espaço nas três dimensões, já que são sintetizadas a partir do mesmo monômero (TOMALIA et al., 1985; CHENG et al., 2008). A estrutura da molécula é dividida em três regiões distintas: um foco central, camada de ligações repetidas partindo do centro e grupos funcionais na camada externa das unidades repetidas (GRAYSON, FRÉCHET, 2001). A cada adição de monômero, o dendrímero aumenta uma geração e esse crescimento pode acontecer de 2 até 32 gerações. É possível se ter precisão de algumas de suas propriedades, tais como tamanho, densidade, polaridade e flexibilidade. Além disso, podem possuir uma cavidade interna, que possibilita o encapsulamento de fármacos hidrofóbicos (KESHARWANI; JAIN; JAIN, 2014).

O tamanho definido e a uniformidade estrutural garantem, de um modo geral, que estes compostos tenham a habilidade de atravessar membranas biológicas, escapando do metabolismo. Ao mesmo tempo, em *drug delivery*, são considerados transportadores relativamente seguros, com baixa citotoxicidade, a qual está relacionada com os grupos terminais. O dendrímero de poliamidoamina (PAMAM), por exemplo, por ter superfície carregada positivamente, pode provocar lise celular com dose dependente. Por outro lado, compostos neutros tem esse efeito menos pronunciado. O mascaramento das

aminas terminais com PEG, acetilações, carboidratos, aminoácidos, podem, portanto, reduzir este efeito indesejável (SADEKAR et al., 2013). Importante mencionar que a adição de grupos espaçantes, como por exemplo ácido succínico e ácido maleico, podem ser úteis no planejamento deste último propósito. Tratam-se de diácidos com 4 carbonos, os quais, quando acoplados aos dendrímeros, são passíveis de sofrerem a ação de um nucleófilo, originado, principalmente, ésteres ou amidas. Outra vantagem do uso dos espaçantes é diminuir o efeito estérico negativo que o dendrímero tem nas reações de formação dos pró-fármacos e no acesso que as enzimas plasmáticas tem aos pró-fármacos.

As sínteses de dendrímeros acontecem com reagentes que tenham dois ou mais grupos eletrófilos e dois ou mais grupos nucleófilos. Essas reações, como apresentado na **Figura 3**, são classificadas, principalmente, como: **(1)** convergentes, quando a síntese acontece da periferia em direção ao núcleo ou **(2)** divergentes quando a reação acontece do foco central em direção ao grupo terminal. As metodologias, muitas vezes, demandam a proteção e desproteção de grupos funcionais para que seja controlada, garantindo, assim, que as gerações dos dendrímeros cresçam como o esperado. Isso faz com que os experimentos sejam, muitas vezes, trabalhosos e custosos, justificando, então, a pouca disponibilidade de compostos comerciais (CHENG et al, 2008; KESHARWANI, JAIN, JAIN, 2014; TWIBANIRE, GRINDLEY, 2014; SELIN et al., 2016).

Figura 3. Principais métodos de síntese dos dendrímeros: convergente e divergente (traduzido de SATIJA et al., 2011).

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Malária e tuberculose representam problemas emergentes em saúde pública, com índices epidemiológicos desastrosos em todo mundo, especialmente em regiões tropicais. Os fármacos disponíveis na terapêutica, por sua vez, mostram-se tóxicos e com eficácia bastante discutida. Já os dendrímeros têm sido amplamente estudados como potenciais transportadores de fármacos. Assim, tendo em vista a necessidade de descobertas de novos compostos para o tratamento destas enfermidades, o objetivo deste trabalho foi a síntese de pró-fármaco dendrimérico potencialmente ativos em malária e tuberculose, utilizando dendrímero de bis-MPA (**Figura 4**). Vale ressaltar que o projeto teve a colaboração do Professor Scott Grayson, da *Tulane University* (USA), responsável por sintetizar os dendrímeros (gerações 0, 1 e 2). No Brasil, fizeram-se as funcionalizações dos dendrímeros com os compostos bioativos. Utilizou-se o ácido succínico como espaçante e as ligações ésteres ou amidas obtidas são passíveis de serem hidrolisadas no organismo.

Os fármacos escolhidos para a produção das formas latentes foram: **(1)** primaquina, com ação antimalárica (BAIRD et al., 2001) e **(2)** isoniazida que, segundo dados publicados por Cattamanchi e colaboradores (2009), apresenta ação nos primeiros estágios da tuberculose (CATTAMANCHI et al., 2009).

Figura 4. Pró-fármaco dendrimérico potencialmente ativo em tuberculose contendo isoniazida. Fez-se esta representação esquemática com o dendrímero de geração 0.

Caracterizaram-se o composto G0-Iso por Ressonância Magnética e

Nuclear (^1H e ^{13}C) e por espectrometria de massas. Por este último método de caracterização estrutural, descobriu-se um intermediário de síntese, a isoniazida succinilada ciclizada (Clso-Suc) (**Figura 5**). Importante mencionar que este composto já foi descrito pelo grupo (RANDO, D.G et al, 2004), em um trabalho com objetivo principal de sintetizar pró-fármacos de isoniazida usando quitosana como transportador. Ressalta-se, entretanto, que a atividade biológica deste intermediário cíclico, bem como estudos de estabilidades química e enzimática não foram investigadas, até o momento. Como são poucas as informações relacionadas com esta molécula, o laboratório coordenado pela Profas Elizabeth Igne Ferreira e Jeanine Giarolla manifestou interesse em pesquisa-lo, principalmente quanto suas propriedades físico-químicas, bem como quanto à atividade biológica. Por esta razão, diante do insucesso de obtenção de pró-fármacos dendriméricos puros, investiu-se na compreensão do mecanismo de hidrólise da Clso-Suc. Desta maneira, , realizaram-se experimentos em pH 1,2, 6,0, 7,4 e 8,5, mimetizando os fisiológicos. Na tentativa de se avançar na compreensão das propriedades deste intermediário, fizeram-se estudos *in silico* para entender a sua interação com a catalase-peroxidase Katg. Em relação aos estudos computacionais, avaliaram-se, também, os modos de interações dos pró-fármacos dendriméricos G0-Iso, G0-Pq, G1-Iso e G1-Pq com uma esterase inespecífica utilizando a abordagem de *docking* molecular. O principal objetivo destas simulações foi compreender a desmontagem da forma latente diante a ação enzimática no organismo.

Figura 5. Representação esquemática do Clso-Suc.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Reagentes e solventes

- Acetato de etila, água, anidrido succínico, clorofórmio, dendrímeros de BISMPA de gerações 1 e 2, diciloexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3,3(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), dimetilaminopiridina (DMAP), dimetilformamida (DMF), etanol, isoniazida, metanol, piridina, pentaeritritol, primaquina, tetraidrofurano (THF), trietilamina (TEA).

3.1.2. Equipamentos

- Agitadores magnéticos
- Aparelho digital Buchi M-565 para determinar faixa de fusão
- Câmara de fotoestabilidade Farma 424 CF Nova Ética
- Cromatografia em Isolera Biotage
- Espectrofotômetro FTIR Bomem MB 100
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz BRUKER, modelo Advanced DPX-300
- Espectrofotômetro UV Beckam DU-70
- Rotaevaporador Büchi

3.1.3. Programas computacionais

Utilizaram-se para desenho das estruturas, visualização, tratamento de macromoléculas e simulações de *docking* molecular, os seguintes programas:

- ChemBioDraw 17.0 (PerkinElmer)
- ChemBio 3D 17.0 (PerkinElmer)
- Chimera (Pettersen et al., 2004)
- Spartan (WaveFunction Inc)
- Discovery Studio 2019 (Accelrys Software Inc)
- Sybyl-X 2.0 (Tripos Inc)
- GOLD 4.1.2 (Verdonk et al., 2003)

3.2. MÉTODOS SINTÉTICOS

3.2.1. Síntese do pró-fármaco succinoilado de isoniazida (Iso-Suc)

(FENG et al, 2002)

Em um balão de reação, adicionaram-se 1,6 mmol de anidrido succínico (0,160 g), 0,16 mmol de DMAP (0,020 g), 1 mmol de isoniazida (0,137 g) e 70 mL de acetato de etila. Manteve-se a reação em temperatura ambiente e agitação constante por 18 horas. Após esse período, rotaevaporou-se o solvente e o produto foi purificado por precipitação em etanol. O esquema de reação está ilustrado na **Figura 4**.

Figura 6. Síntese da Iso-suc.

3.2.2. Síntese do pró-fármaco succinoilado de primaquina (Pq-Suc) (FENG et al, 2002)

Em um balão de reação, adicionaram-se 1,2 mmol de anidrido succínico (0,120 g), 1 mmol de primaquina (0,259 g) e 70 mL de clorofórmio. Manteve-se a reação em temperatura ambiente e agitação constante por 5 horas. Após esse período, rotaevaporou-se o solvente e o produto foi purificado por coluna cromatográfica automática, com sistema eluente acetato de etila:metanol (7:3 v/v). O esquema de reação está ilustrado na **Figura 5**.

3.2.3. Formação de cloreto de ácido de isoniazida *in situ* e posterior reação com dendrímero geração 0 (G0-Iso) (CHAUDHARI, AKAMANCHI, 1999)

Em um balão de reação, adicionaram-se, primeiramente, 4,5 mmol de succinil-isoniazida (1,060 g), 4,2 mmol de cloreto de oxalila (0,357 mL) e uma gota de dimetilformamida (DMF) em 50 mL de acetonitrila. Após o término da

formação de bolhas, colocou-se 1 mmol de pentaeritritol (G0) e 5 mmol de trietilamina (TEA) (0,7 mL). Manteve-se a reação em refluxo de 65 °C e agitação constante por 24 horas. Após esse período, rotaevaporou-se o conteúdo do balão e a purificação foi feita por coluna cromatográfica automática com sistema eluente acetado de etila:metanol (7:3 v/v). O esquema de reação está ilustrado na **Figura 6**.

Figura 8. Esquema 1. Formação do cloreto de ácido de Iso-Suc. Esquema 2. reação de acoplamento do derivado cloreto de ácido da Iso-Suc com o G0.

3.2.4. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de G0 contendo isoniazida (G0-Iso) (MOONEY et al, 2010)

Em um balão de reação, adicionaram-se 1,5 mmol de Iso-suc (0,350 g), 1,5 mmol de EDC (0,287 g) e 75 mL de acetato de etila. Após 5 minutos, colocaram-se 0,15 mmol de DMAP (0,018 g). Depois de mais 30 minutos, adicionou-se 0,5 mmol de pentaeritritol (0,068 g). Manteve-se a reação sob agitação constante e temperatura ambiente por 3 dias, a qual foi acompanhada por Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Após o término da reação, reotaevaporou-se o conteúdo do balão e a purificação do produto foi feita por coluna cromatográfica automatizada usando o sistema eluente acetato de etila:metanol (7:3 v/v). A reação está ilustrada na **Figura 7**.

Figura 9. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de isoniazida geração 0 (G0-Iso).

3.2.5. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de G0 contendo primaquina (G0-Pq) (MOONEY et al, 2010)

Em um balão de reação, adicionaram-se 2,5 mmol de Pq-suc (0,538 g), 1,5 mmol de EDC (0,287 g) e 75 mL de clorofórmio. Após 5 minutos, adicionaram-se 0,15 mmol de DMAP (0,018 g). Depois de mais 30 minutos, colocou-se 0,5 mmol de pentaeritritol (0,068 g). Manteve-se a reação sob agitação constante e temperatura ambiente por 3 dias, a qual foi acompanhada por CCD. Após o término da reação, rotaevaporou-se o conteúdo do balão e a purificação do produto foi feita por coluna cromatográfica automatizada usando o sistema eluente acetato de etila:metanol (7:3 v/v). A reação está ilustrada na **Figura 10**.

Figura 10. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de primaquina geração 0 (G0-Pq).

3.2.6. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de G1 contendo isoniazida (G1-Iso) (MOONEY et al, 2010)

Em um balão de reação, adicionaram-se 2,5 mmol de Iso-suc (0,350 g), 1,5 mmol de EDC (0,287 g) e 75 mL de acetato de etila. Após 5 minutos, colocouse 0,15 mmol de DMAP (0,018 g). Depois de mais 30 minutos, adicionaram-se 0,25 mmol do dendrímero de Bis-MPA geração 1 (0,150 g). Manteve-se a reação sob agitação constante e temperatura ambiente por 3 dias, a qual foi acompanhada por CCD. Após o término da reação, rotaevaporou-se o conteúdo do balão e a purificação do produto foi feita por coluna cromatográfica automatizada usando o sistema eluente acetato de etila:metanol (7:3 v/v). A reação é ilustrada na **Figura 11**.

Figura 11. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de isoniazida geração 1 (G1-Iso).

3.2.7. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de G1 contendo primaquina (G1-Pq) (MOONEY et al, 2010)

Em um balão de reação, adicionaram-se 2,5 mmol de Pq-suc (0,538 g), 1,5 mmol de EDC (0,287 g) e 75 mL de clorofórmio. Após 5 minutos, adicionaram-se 0,15 mmol de DMAP (0,018 g). Depois de mais 30 minutos, colocou-se 0,25 mmol de dendrímero de Bis-MPA geração 1 (0,150 g). Manteve-se a reação sob agitação constante e temperatura ambiente por 3 dias, a qual foi acompanhada por CCD. Após o término da reação, rotaevaporou-se o conteúdo do balão e a purificação do produto foi feita por coluna cromatográfica automatizada usando o sistema eluente acetato de etila:metanol (7:3 v/v). A reação está ilustrada na

Figura 12

Figura 12. Síntese do pró-fármaco dendrimérico de primaquina geração 1 (G1-Pq).

3.2.8. Síntese do pró-fármaco Clso-Suc

Em um balão de reação, adicionaram-se 1,0 mmol de Iso-Suc (0,237 g), 0,16 mmol de DMAP (0,020 g), 1 mmol de EDC (0,192 g) e 70 mL de acetato de etila. Manteve-se a reação em temperatura ambiente e agitação constante por 2 dias. Após esse período, rotaevaporou-se o solvente e a purificação do produto foi feita por coluna cromatográfica automatizada usando o sistema eluente acetato de etila:metanol (7:3 v/v). A reação está ilustrada na **Figura 13**.

Figura 13. Síntese do pró-fármaco ciclizado de isoniazida (Clso-Suc).

3.3 ESTUDOS DE ESTABILIDADE QUÍMICA DE Clso-Suc (NAJLAH et al, 2006)

3.3.1 Desenvolvimento do método analítico

Como ponto de partida para o desenvolvimento do método de identificação e quantificação dos compostos com a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi utilizada, como referência, a metodologia descrita para a isoniazida na Farmacopeia Brasileira – 5ª Edição – Volume 2 (ANVISA, 2010), conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Metodologia farmacopeica e *System Suitability* para análise cromatográfica de isoniazida

Parâmetro	Condição
Detector	UV-Vis
Coluna	Octadecilsilano (5 µm) – 250 mm x 4,6 mm
Temperatura forno	Ambiente
Fluxo de Fase Móvel	1,5 mL/minuto
Fase Móvel	Tampão fosfato (pH 6,9) e metanol – 95:5 (v,v)
Volume de Injeção	20 µL
Pratos Teóricos	>1800
Fator de Cauda	<2,0
Fator de Retenção	>2,35

A partir dos resultados obtidos nestas análises, ajustaram-se os métodos afim de otimizá-los, adequando-os aos compostos descritos na **Figura 5**, conforme descrito na seção “Resultados e Discussão”.

3.3.2. Estudo de estabilidade química

Os estudos de estabilidade química foram realizados com base na metodologia empregada por Najlah e colaboradores (2006), onde a hidrólise dos derivados succinilados foram feitas em pH 7,4 (tampão fosfato 0,02 M), pH 1,2

(tampão de ácido clorídrico 0,06 M), pH 6 (tampão acetato 0,26 M) e pH 8,5 (tampão borato 0,05 M). A reação iniciou com a adição de quantidade adequada do composto a 5 mL de solução tampão pré-aquecida para chegar a concentração final de 2×10^{-6} M. As soluções foram mantidas a 37 °C. Em intervalos de tempos mostrados na **Tabela 2**, amostras (50 µL) foram retiradas e foram adicionados 200 mL de solução metanólica de salicilato de sódio (1,25 mM). As amostras foram armazenadas a -20 °C até que fossem feitas as análises em CLAE. Os parâmetros analíticos utilizados podem ser vistos na **Tabela 1**.

Tabela 2. Parâmetros analíticos para o ensaio de liberação

Parâmetro	Condição										
Detector	UV-Vis a 261 nm										
Coluna	Octadecilsilano (5µm) – 150mm x 4,6 mm										
Temperatura forno	35 °C										
Fluxo de Fase Móvel	<table> <tr> <th>Tempo (min)</th><th>Fluxo (mL/min)</th></tr> <tr> <td>0 , 0</td><td>0 , 6</td></tr> <tr> <td>2 , 0</td><td>0 , 8</td></tr> <tr> <td>5 , 0</td><td>1 , 0</td></tr> <tr> <td>6 , 0</td><td>1 , 8</td></tr> </table>	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	0 , 0	0 , 6	2 , 0	0 , 8	5 , 0	1 , 0	6 , 0	1 , 8
Tempo (min)	Fluxo (mL/min)										
0 , 0	0 , 6										
2 , 0	0 , 8										
5 , 0	1 , 0										
6 , 0	1 , 8										
Fase Móvel	Tampão fosfato (pH 6,9) e metanol (97,5:2,5, v/v)										
Volume de Injeção	60 µL										
Pratos Teóricos	>1800										
Fator de Cauda	<2,0										
Fator de Retenção	>2,35										
Tempo de Corrida	10 minutos										

Tabela 3. Relação entre o número da amostra e o tempo de coleta.

Número da Amostra	Tempo de coleta (horas)
T0	0
T1	0,2
T2	0,3
T3	0,5
T4	0,7
T5	0,8
T6	1
T7	1,5
T8	2
T9	2,5
T10	3
T11	21
T12	24

3.4. Estudos *in silico*

3.4.1. Simulações de *docking* molecular entre os pró-fármacos dendriméricos e esterase inespecífica

Os modelos tridimensionais foram construídos no *software* ChemDraw 17.0 (PerkinElmer). Realizou-se a análise conformacional no programa Chem3D 17.0 (PerkinElmer), utilizando campo de força MMFF94. Adicionou-se a carga parcial AMBER no programa UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004). Em seguida, a otimização da geometria das estruturas, assim como a adição de carga por mecânica molecular (MMFF94) foram realizadas no programa Spartan (WaveFunction Inc).

A esterase humana inespecífica selecionada foi a estrutura cristalizada de carboxilesterase humana (complexada com coenzima A) disponível no *Protein Data Bank* (PDB) com código 2H7C e resolução de 2 Å (YOUNG et al., 2018).

Sabe-se que é uma serino-protease, cujo mecanismo se inicia pelo ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila da Serina 221 a grupos passíveis desta ação, como exemplo, carbonila de éster/amida presentes no dendrímero. Utilizou-se o sítio ativo formado com a tríade catalítica Serina 221, Histidina 468 e Ácido Glutâmico 354 tanto para o re-*docking*, quanto para o *docking* (BENCHARIT et al., 2006).

Tratou-se a enzima selecionada no programa Sybyl-X 2.0 (Tripos Inc). Utilizando-se a ferramenta de preparação da estrutura polimérica, realizou-se a minimização da energia pelo método *conjugate gradient*. Utilizou-se o mesmo programa para verificar e corrigir problemas nas estruturas dos dendrímeros, como ausência de átomos ou ligações, antes de iniciar o *docking*.

Primeiramente, realizou-se o re-*docking* no programa Gold 4.1.2 (Verdonk et al., 2003) para definir a melhor função de *score* a ser aplicada. Utilizaram-se as funções *Astex Statistical Potential* (ASP), cujo melhor resultado dá-se pelo menor valor, e ChemScore (função que estima a mudança de energia livre total que ocorre durante a interação do ligante e do receptor, então, quanto maior seu valor melhor é o resultado). Analisaram-se os dados no programa Discovery Studio 2019 (Accelrys Software Inc), comparando as poses obtidas através de diagrama 2D de interações entre o ligante e a enzima. A função cuja pose obteve o maior número médio de interações foi selecionada para a realização do *docking* com os compostos.

Realizaram-se as simulações de *docking* molecular, também, no Gold 4.1.2 (Verdonk et al, 2003), bem como no Autodock (Trott, Olson, 2010), ambos em triplicata, totalizando 240 simulações. Foram mantidos os aminoácidos Histidina 468, Serina 221 e Ácido Glutâmico 354 e as moléculas de água com distância inferior a 4 Å em relação ao oxigênio da hidroxila da Serina 221, as quais participam do processo de catálise (BENCHARIT et al., 2006).

Analisaram-se os resultados de *docking* molecular do Gold (Verdonk et al, 2003) com base nos complexos enzima-pró-fármacos dendriméricos de melhor *Root Mean Square deviation* (RMSd), *score* e de distância igual ou inferior a 3 Å entre a carbonila dos ésteres e amidas das estruturas, distância esta considerada favorável para ligação de hidrogênio (JIANG, LAI, 2002).

Já no AutoDock (Trott, Olson, 2010), foram gerados os arquivos para *input* no AutoDockVina (Trott et al., 2010) utilizando: **(1)** as configurações padrões do

programa; **(2)** o arquivo com o ligante e o com a proteína; **(3)** o arquivo dos parâmetros contendo informações sobre a proteína e o ligante; **(4)** as dimensões da *grid box* e **(5)** sua localização na enzima (coordenadas do *gridcenter*). O AutoDock (Trott, Olson, 2010) utiliza *Affinity* como *score* e gera o próprio valor de RMSd para possibilitar a análise dos resultados. Por fim, selecionaram-se os melhores resultados com o auxílio do programa AutoDockVina (Trott et al., 2010), utilizando como base os menores valores de energia no cluster. Para a visualização dos complexos enzima-ligante e para a determinação das distâncias das interações, utilizou-se o programa Discovery Studio 2019 (Accelrys Software Inc).

3.4.2. Simulações de *docking* molecular entre a Clso-Suc e a catalase-peroxidase

Do mesmo modo que o item anterior, os modelos tridimensionais foram construídos no software ChemDraw 17.0 (PerkinElmer). A análise conformacional foi realizada no programa Chem3D 17.0 (PerkinElmer), utilizando campo de força MMFF94. A carga parcial AMBER foi adicionada no programa UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004). Em seguida, a otimização da geometria das estruturas assim como a adição de carga por método quântico (Hartree-fock 6-31+G*) foram realizadas no programa Spartan (WaveFunction Inc).

O cristal da catalase-peroxidase do *Micobacterium tuberculosis* com o grupo heme como cofator selecionado foi o da enzima selvagem disponível no PDB com código 1SJ2, com resolução 2,4 Å (BERTRAND et al, 2004). Tratouse a enzima selecionada no programa Sybyl-X 2.0 (Tripos Inc). Utilizando-se a ferramenta de preparação da estrutura polimérica, realizou-se a minimização da energia pelo método *conjugate gradient*. Utilizou-se o mesmo programa para verificar e corrigir problemas nas estruturas dos ligantes, como ausência de átomos ou ligações, antes de iniciar as simulações de *docking* molecular.

Realizaram-se os cálculos no Gold 4.1.2 (Verdonk et al, 2003). Nesse programa, o *docking* foi feito após a adição de hidrogênio, em configurações padrões e foi calculado em triplicata. Selecionou-se o átomo de ferro como *binding site* por sua relevância no mecanismo de ação da enzima. Utilizaram-se

as funções ASP e ChemScore (função que estima a mudança de energia livre total que ocorre durante a interação do ligante e do receptor).

Analysaram-se os resultados resultantes do Gold (Verdonk et al, 2003) com base nas interações dos ligantes com os aminoácidos, **a)** distância média (em Å) em relação ao átomo de ferro do grupo heme e **b)** valores obtidos para os scores. Para a visualização dos complexos enzima-ligante e para a determinação das distâncias das interações, utilizou-se o programa Discovery Studio 2019 (Accelrys Software Inc).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. METODOLOGIA SINTÉTICA

4.1.1. Síntese dos derivados succinilados de isoniazida e de primaquina (Iso-Suc e Iso-Pq)

Nos resultados de Ressonância Magnética e Nuclear (RMN) da Iso-Suc, observaram-se deslocamentos químicos nos espectros de ^1H (**Espectro 1**) e de ^{13}C (**Espectro 2**), quando comparados com os dados encontrados literatura sobre a isoniazida (de ASSIS et al, 2012), os quais serão discutidos a seguir. O primeiro deles foi o do sinal dos dois hidrogênios da amina primária da hidrazida (H4), o qual foi de 4,5 ppm (isoniazida) para 10,61 ppm (produto). Já o segundo, verificado no RMN de ^{13}C , está relacionado com o carbono da carbonila (C6), o qual passou de 167,2 ppm (isoniazida) para 163,88 ppm (produto). Os sinais do ácido succínico também estão presentes no RMN de ^1H , com deslocamento químicos em 2,69 ppm (H2). Importante mencionar que as integrais estão ligeiramente diferentes do esperado, pois o sinal do solvente deuterado (DMSO) também aparece nessa região. Houve, também, alteração deste último sinal, o qual deveria aparecer como dois tripletos, no entanto, verifica-se um multipeto. Observa-se a água de DMSO em 3,30 ppm. Já os carbonos do espaçante succínico também estão no RMN de ^{13}C . Os carbonos carbonílicos C1 e C3 estão, respectivamente, em 170,41 e 173,45 ppm. A diferença se dá pelo fato do ácido carboxílico estar mais blindado que a cetohidrazida, cuja ressonância deslocaliza seus elétrons. Observaram-se os carbonos centrais do ácido succínico (C2) em 28,12 e 28,34 ppm.

Espectro 1. RMN de ^1H da Iso-Suc.

^1H -RMN (DMSO), 300 MHz, δ = ppm

H5: 10.61 (s, 1H), H4: 10.01 (s, 1H), H8: 8.74 (d, J = 5.6 Hz, 2H), H7: 7.75 (d, J = 5.7 Hz, 2H), H2: 2.76 – 2.62 (m, 4H).

Espectro 2. RMN de ^{13}C da Iso-Suc.

^{13}C -RMN (DMSO), 75 MHz, $\square$ = ppm

C3: 173.45, C1 - 170.41, C6: 163.86, C8: 150.34, C9: 139.48, C7: 121.26, C2: 28.74, C2: 28.12.

Os espectros no infravermelho (IV) ajudam a caracterizar compostos, uma vez que demonstram estiramentos e deformações de grupos funcionais característicos de cada molécula (SILVERSTEIN, 2006). A análise do espectro no IV indicou, igualmente, a formação do produto Iso-suc, com as bandas características em 1705 cm^{-1} ($\lambda_{\text{C=O}}$ axial de ácido carboxílico) e em 1604 cm^{-1} relacionado com $\lambda_{\text{C=O}}$ da hidrazida (**Espectro 3**).

Espectro 3. Espectro no IV (λ , KBr, cm^{-1}) da Iso-Suc.

Na síntese do derivado succinilado de primaquina, não houve a necessidade de utilizar catalisador, uma vez que a amina primária da primaquina é um bom nucleófilo para atacar diretamente uma das carbonilas do anidrido succínico para formar o produto em até 5 horas. Assim, alguns deslocamentos químicos no RMN de ^1H e ^{13}C (**Espectro 4 e Espectro 5**), quando comparados com o padrão primaquina (Espectro I, Anexo I), indicaram a formação do produto de interesse. No RMN de ^1H , por exemplo, os sinais dos hidrogênios da amina primária (H16) deslocam de 1,50 ppm (primaquina) para 7,30 ppm (produto). Os hidrogênios do carbono ligado à amina primária (H11), por sua vez, deslocam de 2,6 ppm (primaquina) para 3,16 ppm (produto). No ^{13}C RMN, o sinal do carbono ligado à amina primária (C11) deslocou de 42 ppm (primaquina) para 39 ppm após a formação da amida. Os sinais do ácido succínico também sugeriram a formação do derivado. No RMN de ^1H , há o sinal em 2,66 ppm referente aos hidrogênios H21 e H22, porém, como na mesma região há o sinal do H1, as integrais, quando somadas, resultaram em 5 hidrogênios. O resíduo do solvente deuterado (CDCl_3) apareceu em 7,30 ppm junto com o H16, o que modificou a

respectiva integral e distorceu a multiplicidade deste sinal. No RMN de ^{13}C , os sinais em 174,95 ppm, referente ao C22, e o em 172,58 ppm, do C19, sugerem o acoplamento do ácido succínico, com formação do ácido carboxílico e da amida. Ademais, os sinais em 29,67 e 31,75 ppm (C20 e C21) também reforçam a possível obtenção deste pró-fármaco. Vale ressaltar que os sinais em 4,09 ppm e 1,97 ppm (espectro de ^1H) são resíduos de acetato de etila utilizado no processo de purificação.

Espectro 4. RMN de ^1H do produto PQ-Suc.

^1H -RMN (CDCl_3), 300 MHz, δ = ppm

H14: 8.49 (d, J = 3.0 Hz, 1H), H13: 7.92 (d, J = 8.1 Hz, 1H), H16 e H17: 7.46 – 7.16 (m, 2H), H6 e H12: 6.28 (d, J = 14.3 Hz, 2H), H0: 5.99 (s, 1H), H18: 3.81 (d, J = 9.3 Hz, 3H), H11: 3.22 (s, 2H), H21 e H22: 2.62 (dd, J = 13.4, 7.0 Hz, 4H), H1: 2.39 (d, J = 6.0 Hz, 1H), H3 e H7: 1.60 (s, 4H), H4: 1.19 (dd, J = 10.0, 4.3 Hz, 3H).

Espectro 5. RMN de ^{13}C do produto Pq-Suc.

^{13}C -RMN (CDCl_3), 75 MHz, δ = ppm

C24: 174.95, C22: 172.58, C10: 159.51, C14: 144.77, C2: 144.03, C13: 135.98, C5: 134.67, C8: 130.40, C13: 121.80, C6: 97.90, C12: 92.23, C18: 55.27, C1: 48.10, C11: 39.22, C3: 34.26, C21: 31.75, C20: 29.67, C7: 26.70, C4: 20.56.

4.1.2. Síntese dos pró-fármacos dendriméricos de geração 0 (G0-Iso e G0-Pq)

Para a síntese dos dendrímeros de geração 0 (G0-Iso e G0-Pq), utilizouse a esterificação de Steglich, a qual contém um agente condensante, geralmente dicianilcarbodiimida (DCC), além de um catalisador básico, o

4dimetilaminopiridina (DMAP), por exemplo. Nas reações com DCC e DMAP, há um primeiro ataque no DCC pela carbonila do ácido (previamente desprotonada pelo nitrogênio do DCC), que é, então, substituído, em um segundo ataque, pelo DMAP. Após o acoplamento com o DMAP, há a liberação de dicicloexilureia (DCU), subproduto característico da reação. Assim, forma-se um intermediário com carga positiva e excelente grupo de saída, facilitando o ataque nucleofílico do álcool. Este mecanismo de reação é ilustrado na **Figura 17** (NEISES et al, 1979).

Figura 14. Mecanismo de reação das reações com o agente condensante DCC (NEISES et al, 1979).

A remoção do DCU não é uma tarefa simples. Não se conseguiu retirar esse subproduto em nenhum dos compostos sintetizados por este método. O **Espectro 6**, por exemplo, demonstra este resultado. Neste, é possível verificar os sinais característicos desta impureza na região entre 1 e 1,5 ppm. Tentaram-se, assim, outros métodos para a síntese dos produtos aqui planejados.

Espectro 6. RMN de ^1H do produto G0-Pq. Observam-se os sinais característicos do DCU na região entre 1-1,5 ppm.

Uma tentativa de formação de G0-Iso, sem a utilização de DCC, foi a formação de cloreto de ácido *in situ* a partir da Iso-suc para, posteriormente, reagir com o G0. Essa reação aconteceu usando cloreto de oxalila, que é, inicialmente, atacado pelo oxigênio da carbonila do DMF e, após uma série de rearranjos, há um ataque de um ânion Cl^- e a liberação de HCl e CO_2 . A **Figura 18** ilustra o mecanismo (CHAUDHARI, AKAMANCHI, 1999).

Figura 15. Mecanismo de reação de formação de cloreto de ácido utilizando cloreto de oxalila (CHAUDHARI, AKAMANCHI, 1999)

A reação não foi bem-sucedida. Após o procedimento de purificação em coluna cromatográfica, não houve o aparecimento de algum sinal na CCD. Isso possivelmente aconteceu devido a presença de água no solvente e/ou na base utilizada na reação. Haveria, portanto, a necessidade de destilações e processos de secagem de todos os reagentes para se alcançar sucesso por este método.

Na tentativa de evitar a formação de DCU, substituiu-se o DCC por outro agente condensante, o 1-etil-3,3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). O mecanismo da reação é o mesmo, porém, o subproduto formado é o 1(3(dimetilamino)-propil-3-metilureia (EDU), como ilustrado na **Figura 19**. Este composto é retirado de modo mais fácil, uma vez que, na sílica da coluna cromatográfica, a amina terciária é protonada e fica retida na fase estacionária (MOONEY et al, 2010).

Figura 16. Esquema simplificado da transformação de EDC em EDU nas reações de esterificação.

Nos espectros de RMN de ^1H (**Espectro 10**) e ^{13}C (**Espectro 11**) do G0Pq, há os sinais característicos já discutidos da Pq-Suc em 3,18 ppm (H13), 2,55 ppm (H16) e 2,33 ppm (H17). Já no RMN de ^{13}C , observaram-se 28,69 ppm (C17), 30,10 ppm (C16) e 38,55 (C13). Os sinais a mais característicos deste pró-fármaco são os dos hidrogênios e carbonos do pentaeritritol. No RMN de ^1H , há os sinais em 3,93 ppm (H19) para os grupos substituídos e 3,54 (H19*) para os não substituídos. No RMN de ^{13}C , há o sinal em 59,65 ppm referente ao C19. Vale ressaltar que o sinal dos três hidrogênios H21 da primaquina deslocam para a mesma região do H19 do pentaeritritol, aumentando o tamanho do sinal e sua integral. O RMN de ^1H mostra, também, que ainda há traços de acetato de etila utilizado na purificação, sendo que os sinais de seus hidrogênios apareceram em 4,08, 1,96 e 1,18 ppm. Este último está na mesma região do H10, o que pode modificar a sua integral.

Espectro 7. Espectro de RMN de ^1H do produto G0-Pq.

^1H -RMN (CDCl_3), 300 MHz, δ = ppm

H3: 8.69 – 8.27 (m, 1H), H1: 7.84 (dd, J = 8.2, 2.3 Hz, 1H), H12 e H14: 7.35 – 7.07 (m, 2H), H6 e H7: 6.47 – 6.05 (m, 2H), H8: 5.71 (s, 1H), H19 e H21: 4.02 – 3.66 (m, 5H), H19*: 3.54 (s, 1H), H13: 3.45 – 2.93 (m, 2H), H16 e H9: 2.65 – 2.46 (m, 3H), H17: 2.44 – 2.22 (m, 2H), H11 e H12: 1.61 (t, J = 11.1 Hz, 4H), H10: 1.45 – 0.93 (m, 3H).

Espectro 8. RMN de ^{13}C do produto G0-Pq.

^{13}C -RMN (CDCl_3), 75 MHz, δ = ppm

C18: 172.05, C15: 170.44, C23: 158.48, C3: 143.95, C22: 143.32, C1: 134.38, C4: 133.81, C5: 128.94, C2: 120.85, C7: 95.84, C6: 90.77, C19: 59.65, C21: 54.20, C9: 46.87, C13: 38.55, C11: 32.96, C17: 30.10, C16: 28.69, C12: 25.26, C10: 19.58.

No IV do produto G0-Pq, assim como no do G0-Iso, destacam-se as bandas 1731 e 1651 cm^{-1} que correspondem, respectivamente, aos estiramentos de grupos éster e amida. A banda em 2932 cm^{-1} , por sua vez, pode ser da amina secundária presente na estrutura da primaquina. Já a ausência de um sinal muito pronunciado em 3362 cm^{-1} pode representar a presença de poucas hidroxilas livres. A **Espectro 12** ilustra o espectro de IV do G0-Pq.

Espectro 9. Espectro no infravermelho do produto G0-Pq.

Nos espectros de RMN de ^1H (**Espectro 7**) e ^{13}C (**Espectro 8**) do G0-Iso, além dos sinais da Iso-Suc em 8,66 ppm (H1 e H3), 7,75 ppm (H9) e 2,79 ppm (H10), é possível notar a presença dos hidrogênios do pentaeritritol. No G0, há um carbono quaternário (C13) vinculado à quatro grupos hidroximetil (C12). No RMN de ^1H do pentaeritritol (Espectos II e III, Anexo I), há, somente, dois sinais: um singleto em 3,39 ppm, correspondendo aos hidrogênios do grupo metila (H12) e um sinal largo em 4,24 ppm, relacionado com os hidrogênios das hidroxilas. No RMN de ^{13}C , por sua vez, apareceram dois sinais: um em 63,3 ppm, correspondente aos carbonos do grupo hidroximetil (C12) e outro em 48,2 ppm, relativo ao carbono central (C13). Esse último pode não aparecer em alguns espectros, uma vez que carbonos quaternários demandam mais tempo de análise, ou necessitam de aparelhos com uma frequência de campo maior (SILVERSTEIN, 2006). No Go-Iso, os sinais de H12 do G0 apareceram, no RMN de ^1H , em 4,70 ppm. Já no RMN de ^{13}C , os sinais de C12 foram vistos em 63,39 ppm. Vale destacar que há a presença de um pequeno sinal em 3,22 ppm

(espectro de ^1H), que corresponde ao H12 que não foi substituído, chamado então de H12*.

Espectro 10. RMN de ^1H do produto G0-Iso.

^1H -RMN (MeOD), 300 MHz, δ = ppm

H1 e H3: 8.64 (dd, J = 16.8, 6.0 Hz, 2H), H2 e H4: 7.93 – 7.39 (m, 2H), H12: 4.70 (s, 2H), H12*: 4.14 (s, 1H), H12: 3.77 – 3.34 (m, 2H), H9 e H10: 2.89 – 2.31 (m, 4H).

Espectro 11. RMN de ^{13}C do produto G0-Iso.

^{13}C -RMN (MeOD), 75 MHz, δ = ppm

C8 e C11: 175.66, C5: 166.24, C1 e C3: 151.35, C14: 140.78, C2 e C4: 123.14, C12: 63.39, C9 e C10: 27.60 (s).

No IV do G0-iso (**Espectro 9**), destacam-se as bandas em 1723 e 1685 cm^{-1} representando os estiramentos de carbonila de éster e de amida, respectivamente. É importante destacar que a banda em 3279 cm^{-1} , que

representa as hidroxilas livres, foi bem pequena, indicando que a maioria destes grupos funcionais foi substituída.

Espectro 12. Espectro no infravermelho do produto G0-Iso.

Na análise do resultado proveniente da Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) do G0-Iso mostrou que, no picos de menor intensidade entre 4,5 minutos e 4,8 minutos e no de 8,1 minutos, houve a formação majoritariamente do produto monosubstituído ($M+H^+ = 238,5$), ou seja, das quatro hidroxilas livres presentes no pentaeritritol, uma foi substituída. Há alguns sinais das outras substituições, porém com muito menos intensidade do que a monosubstituída.

Figura 17. LC-MS de G0-Iso impuro. Condições de análise: Condições de análise no LC: solvente A (0,1% Ácido Fórmico/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Condições de análise no MS: voltagem no capilar (4500 V) e temperatura (325 °C), 20 µL de amostra.

Importante mencionar, ainda, que o o resultado de LC-MS revelou um componente importante $[M+H]^+ = 220,02$, eluído em 12,8 minutos , que não é compatível com nenhum reagente ou dendrímero substituído.

Figura 18. Composto do pico majoritário do LC-MS .Condições de análise: Condições de análise no LC: solvente A (0,1% Ácido Fórmico/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Condições de análise no MS: voltagem no capilar (4500 V) e temperatura (325 °C), 20 µ de amostra.

Ademais, o R_f deste produto em CCD (valor de 0,65 em fase móvel Acetato de Etila:Metanol (8:2), v/v) indicava a formação de um sub-produto. Considerando a estrutura química da Iso-Suc, possivelmente, ocorreu um ataque nucleofílico intramolecular dos nitrogênios da hidrazona ao ácido carboxílico livre. Esse ataque resultaria em um subproduto ciclizado de 5 ou 6 membros (**Figura 22**). Tanto o subproduto de 5 membros, quanto o de 6, tem uma $[M+H]^+$ de 220 g/mol e o logP, quando comparado aos reagentes, corroboram com os dados encontrados na CCD. Todas estas informações estão descritas na **Figura 23**, que mostra o valor de logP muito similar das duas moléculas, o que indica dificuldade de separa-las na cromatografia.

Figura 19. Estruturas químicas e algumas das propriedades da Clso-Suc de 6 e 5 membros.

Figura 20. LogP da Clso-Suc de 6 membros (esqueda) e 5 membros (direita).

Afim de tentar entender o mecanismo de reação relacionado com a formação desses subprodutos, foram feitos experimentos trocando as condições

reacionais. Devido ao fato de serem nitrogênios provenientes de amidas, o ataque intramolecular do nitrogênio na carbonila só poderia ser favorecido frente ao ataque das hidroxilas livres do pentaritról, caso os nitrogênios da hidrazona fossem desprotonados, ganhando assim uma carga negativa. Assim, esses nitrogênios seriam mais eletronegativos do que as hidroxilas, favorecendo o seu ataque. Essa carga então poderia reagir com o ácido carboxílico. Ao retirar o próton o ataque poderia ocorrer vindo do nitrogênio mais próximo ao anel aromático, formando o ciclizado de 6 membros. Esse ataque também pode ocorrer vindo do nitrogênio mais próximo ao ácido succínico, formando assim o derivado de 5 membros. O mecanismo proposto está exposto na **Figura 24**. (CLAYDEN, et al, 2012)

Figura 21. Mecanismo proposto de formação da Clso-Suc.

O valor de pKa dos hidrogênios acoplados aos nitrogênios da Iso-Suc são de 9,04 e 11,46, assim, na presença de EDC com a sua amina terciária e o DMAP que é uma base orgânica, seria possível a desprotonação de algum desses nitrogênios. Com isso, foi testado uma reação utilizando DCC e hidroxibenzotrazol (HOBT), ambos não contêm nenhum grupo que seja capaz de retirar os prótons, e não houve sinal de formação de Clso-Suc, o que é um indicativo de que o mecanismo proposto está correto.

Os RMN's de ^1H e ^{13}C das formas ciclizadas são muito similares aos encontrados para a Iso-Suc, havendo sinais nas mesmas regiões, com os iguais valores das integrais. Ademais, por técnicas de RMN, é muito difícil diferenciar qual dos produtos ciclizados foi formado, ou seja, com 5 ou o de 6 membros (SILVERSTEIN, 2006). Como apresentado no **Espectro 13** (RMN de ^1H), foram observados sinais dos hidrogênios do anel aromático entre 7 e 9 ppm, bem como

os hidrogênios ligados aos carbonos do ácido succínico estão entre 2,5 e 3 ppm. Do mesmo modo, o RMN de ^{13}C (**Espectro 14**) é bem semelhante ao da IsoSuc. Importante ressaltar que para Clso-Suc, de 5 ou 6 membros, verificaram-se que os carbonos 11 e 14 apareciam em um único sinal com deslocamento químico de 174,01 ppm. Por ser uma banda só, ela pode indicar que a ligação formada é simétrica, situação que ocorre no no anel de 5 membros (CLAYDEN et al, 2012).

Espectro 13. Espectro de ^1H RMN do produto Clso-Suc

^1H -RMN (DMSO- D_6), 300 MHz, δ = ppm

H8 ou 10: 11.41 (s, 1H); H1 e H3 8.83 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H); H4 e H6: 7.82 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H); H13 e H14: 2.88 (s, 4H).

Espectro 14. Espectro de ^{13}C RMN do produto Clso-Suc.

^{13}C -RMN (DMSO), 75 MHz, δ = ppm

C11 e C14: 174.01, C7: 167.49, C3 e C1: 150.63, C5: 138.05, C4 e C6: 121.37, C12 e C13: 26.37.

4.1.3. Síntese dos pró-fármacos dendriméricos de geração 1 (G1Iso e G1-Pq)

O dendrímero de geração 1 (G1) é o pentaeritritol esterificado nas hidroxilas por quatro moléculas de *Bis*-MPA, totalizando 8 hidroxilas livres (**Figura 25**).

Figura 22. Dendrímero de Bis-MPA de geração 1.

Os experimentos com os dendrímeros de primeira geração utilizaram a mesma metodologia dos com geração 0, ou seja, reações de acoplamentos com o agente condensante EDC e a base DMAP. Estes seguem, portanto, o mesmo mecanismo reacional, ilustrado na **Figura 17**. Importante mencionar, entretanto, que as diferenças principais entre as metodologias envolvendo G0 e G1 foram a proporção estequiométrica dos reagentes e o tempo de reação. Os métodos com geração 0 duravam, no máximo 3 dias. O aumento do número de hidroxilas do G0 para o G1 justifica a necessidade de aumentar o tempo de reação.

No RMN de ^1H do material de partida (G1) (Espectro IV, anexo I), além dos sinais em 3,87 ppm do pentaeritritol (H12), há o sinal em 3,12 ppm (H11), o qual está relacionado com os H11. Existe, também, um em 1,19 ppm (H10) correspondente à metila do Bis-MPA. Já no RMN de ^{13}C , o principal carbono é o ligado a hidroxila (C11), que apareceu em 63,77 ppm (Espectro V, Anexo I). Em G1-Iso, por sua vez, observou-se um sinal em 4,70 ppm (H11), o qual teve um deslocamento de quase 0,8 ppm, quando comparado ao mesmo átomo do material de partida. Em 4,12 ppm apareceu um sinal que pode corresponder aos hidrogênios do derivado não substituído (H11*). Já no No RMN de ^{13}C não foi possível notar a diferença entre substituído e não substituído, sendo que o C11 apareceu em 66,01 ppm.

^{13}C -RMN (MeOD), 75 MHz, $\square$ = ppm

C3: 176.07, C1: 175.88, C14: 175.69, C6: 166.26, C8: 151.22, C9: 140.79, C7: 123.16, C11: 66.01, C12: 63.05, C2: 29.80, C2': 29.43, C10: 17.33.

No pró-fármaco dendrímero de G1 funcionalizado com primaquina (G1Pq), foi possível visualizar os sinais do dendrímero (H26 e H29) em 4,07 e 3,92 ppm, respectivamente, porém esse último apareceu com mesmo

deslocamento químico do H18 da primaquina, em 3,92 ppm (**Espectro 17**). Esta região ficou, então, de difícil interpretação e as integrais não se mostraram como esperado. O sinal em 3,55 ppm é do derivado não substituído, por isso, recebeu a denominação de H26* para esta diferenciação. Todos os outros sinais, tanto da primaquina, quanto do espaçante, estão de acordo com o que já foi discutido anteriormente. Além disso, vale destacar que há traços de acetato de etila utilizado na purificação, com os sinais em 1,18, 1,96 e 4,07 ppm. O primeiro e o último foram vistos nas mesmas regiões do produto desejado, o que pode explicar a variação no valor da integral. No RMN de ^{13}C é possível destacar o sinal em 59,65 ppm e 59,37 ppm referente ao C26 e C29 do dendrímero, além dos sinais 170,46 ppm e 172,06 ppm referentes aos carbonos de éster (C26 e C29) e de amida (C19).

Espectro 17. RMN de ^1H do produto G1-Pq.

^1H -RMN (CDCl_3), 300 MHz, $\square$ = ppm

H14: 8.45 (dd, J = 4.2, 1.6 Hz, 1H), H13: 7.84 (dd, J = 8.3, 1.5 Hz, 1H), H16 e H17: 7.34 – 7.03 (m, 2H), H6 e H12: 6.23 (dd, J = 16.2, 2.4 Hz, 2H), H14: 5.73 (s, 1H), H26 4.42 – 4.05 (m, 2H), H18 e H29 : 4.05 – 3.80 (m, 5H), H26*: 3.55 (d, J = 6.0 Hz, 1H), H11: 3.54 – 2.82 (m, 2H), H20 e H21: 2.45 (dt, J = 66.3, 6.8 Hz, 4H), H3 e H7: 1.77 – 1.50 (m, 4H), H4: 1.50 – 1.10 (m, 3H).

Espectro 18. RMN de ¹³C do produto G1-Pq.

¹³C-RMN (CDCl₃), 75 MHz, □ = ppm

C28: 172.06, C19 e C22: 170.46, C10: 158.48, C14: 143.95, C2: 143.30, C5: 134.34, C13: 133.83, C8: 128.94, C17: 120.84, C6: 95.85, C12: 90.77, C29: 59.65, C26: 59.37, C18: 54.20, C1 46.86, C11: 38.55, C3: 32.95, C21: 30.10, C20: 28.69, C7: 25.25, C4: 19.58, C27: 13.14.

4.2. ESTUDOS *IN SILICO*

Os estudos computacionais foram feitos em colaboração com aluna de Iniciação Científica Sophia Mikiko.

4.2.1. Simulações de *docking* molecular entre os pró-fármacos dendriméricos e esterase inespecífica

Nesta etapa do projeto, pretendeu-se avaliar, com a estratégia de *docking* molecular, as interações entre os dendrímeros G0-Iso e G0-Pq, bem como G1-Iso e G1-Pq e a butirilcolinesterase, esterase inespecífica capaz de clivar ligações ésteres/amidas no organismo humano (STOK et al., 2004). Estes resultados serão úteis, portanto, para a previsão da hidrólise destes compostos *in vitro*. Ressaltam-se que as carbonilas de interesse foram nomeadas como C1 (do dendrímero G1 ou próxima ao dendrímero G0) e C2 (próximas aos fármacos no dendrímero G0) e C3 (próximas aos fármacos no dendrímero G1).

Figura 23. Pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos em malária ou tuberculose. Representaram-se as gerações 0 (esquema 1) e 1 (esquema 2).

Destacaram-se nos quadrados: a) isoniazida succinoilada e b) primaquina succinoilada. As carbonilas de interesse estão realçadas em vermelho e verde na figura.

4.2.2. Re-docking no programa GOLD (Verdonk et al, 2003)

Nas simulações de re-docking, compararam-se as interações do ligante-proteína resultantes dos cálculos com as provenientes dos dados de cristalografia. Como resultado, selecionou-se a função ASP devido à maior média de interações entre o ligante e a proteína, quando comparados com o padrão proveniente do PDB. Escolheu-se, então, a pose com maior número destas interações. Mesmo ocupando o quinto lugar no *ranking* de *score*, definiu-se o conformero 4 como melhor resultado (Quadro 1), visualizado na **Figura 27**.

Figura 24. Conformer 4 do re-docking do ligante na enzima 2H7C.

Sabe-se que o valor desejável para *Root Mean Square Deviation* (RMSd), o qual compara a similaridade entre a disposição dos átomos no espaço do modelo gerado com os da estrutura referência, é em torno de 1,5 Å (MAIOROV & CRIPPEN, 1994). Não se observou valores próximos a 1,5 Å nas funções de

score utilizadas, uma vez que se tratam de ligantes peptídicos, com alta flexibilidade das ligações químicas (YAN, ZHANG & HUANG, 2017).

Tabela 4. Resultados obtidos no re-docking realizados programa GOLD (Verdonk et al, 2003)

Score	Número médio de interações com a esterase	Confômero	Interações comuns em relação ao ligante cristalografado	Ranking no score	RMSd (Å)
ChemScore	4,4	1	6	30°	11.9812
		9	6	14°	12.2085
		14	6	9°	13.2515
		27	6	17°	13.6043
ASP	4,53	4	6	5°	9.5287
		1	5	24°	9.4263
		3	5	14°	9.3413
		8	5	12°	9.5587

Para a confirmação do RMSd do Dock 4, este desvio foi calculado em três programas diferentes: o Discovery Studio, Chimera e Pymol. Conforme os resultados na tabela 5, todos os valores de RMSd estavam fora do desejável por se tratar de um ligante peptídico, uma molécula com elevado grau de flexibilidade.

Tabela 5. Melhor pose obtida no re-docking com o programa GOLD e confirmação do RMSd

Confômer o	ASP	Interações comuns em relação ao ligante cristalografado	RMSd Discovery	RMSd Chimera	RMSd Pymol
4	-923,753	6	9.5287	9.786	4.836

4.2.3. Resultados de *docking* no programa GOLD (Verdonk et al, 2003)

A seleção dos resultados gerados pelo programa GOLD (Verdonk et al, 2003) foi feita com base, principalmente, na distâncias entre os carbonos das carbonilas dos dendrímeros (C1, C2 e C3) e o oxigênio da hidroxila da Serina 221, conforme Quadro 3. Importante mencionar que este valor deve ser inferior a 3 Å, possibilitando, assim, o ataque nucleofílico da Serina 221 na carbonila de interesse (ARANTES, 2008).

Como mostrado na Figura 3, o mecanismo geral da catálise da serinoprotease inicia-se pelo ataque nucleofílico na carbonila do substrato pela serina, auxiliado pela histidina que age como catalisador ácido-base, gerando um intermediário tetraédrico. Este último composto é instável e, ao final do processo, há a liberação de ácido carboxílico e a regeneração da enzima (HEDSTROM, 2002).

G0 - isoniazida				G1 - isoniazida					G0 - primaquina				G1 - primaquina				
Dock	ASP	C1	C2	Dock	ASP	C1	C2	C3	Dock	ASP	C1	C2	Dock	ASP	C1	C2	C3
1	-284.644	6.197	3.959	1	-1200.100	3.138	3.739	6.610	1	-482.581	2.186	2.786	1	-1843.230	2.159	3.499	7.075
2	-237.664	4.546	1.905	2	-1174.380	1.706	4.025	6.166	2	-523.834	6.626	6.146	2	-2037.290	2.319	4.944	7.642
3	-216.762	5.075	3.945	3	-945.340	4.642	3.116	3.401	3	-358.235	6.240	6.522	3	-2312.700	1.052	3.749	3.731
4	-243.083	4.423	3.789	4	-1138.710	2.640	5.394	7.730	4	-540.484	4.222	1.259	4	-2106.440	2.454	3.382	5.154
5	-181.293	5.104	4.347	5	-902.605	3.516	2.518	5.636	5	-717.754	1.832	3.389	5	-1827.760	6.449	4.157	3.048
6	-179.357	3.635	5.663	6	-1129.310	3.095	3.751	5.800	6	-483.843	3.572	2.599	6	-1912.980	2.862	3.719	6.389
7	-255.653	3.641	4.972	7	-1200.560	4.298	1.292	2.964	7	-388.070	2.593	3.591	7	-1949.330	2.827	3.114	5.070
8	-232.717	4.094	4.985	8	-922.408	7.687	4.669	1.674	8	-490.344	3.679	5.857	8	-1875.270	2.835	3.958	5.970
9	-274.989	5.297	4.262	9	-1005.250	4.770	3.742	6.839	9	-560.853	2.614	5.948	9	-2056.360	2.904	2.195	5.542
10	-297.450	3.791	2.482	10	-1074.690	1.793	4.719	4.402	10	-575.206	3.715	1.490	10	-1679.360	2.666	3.925	6.400
11	-176.970	5.244	5.395	11	-904.774	6.508	3.842	4.491	11	-528.367	2.478	2.068	11	-2062.430	3.800	1.590	4.430
12	-266.264	4.830	5.677	12	-1201.040	2.230	3.912	4.891	12	-436.813	3.716	2.839	12	-2117.130	5.071	1.114	2.932
13	-258.054	4.187	5.736	13	-1127.850	2.337	3.981	6.675	13	-561.054	5.960	3.332	13	-2362.290	3.892	2.822	4.842
14	-239.157	3.321	2.859	14	-1138.140	4.029	2.458	5.308	14	-388.619	3.292	5.414	14	-1722.670	3.115	4.109	5.780
15	-214.434	2.734	3.766	15	-1043.000	3.639	4.097	3.229	15	-430.298	4.835	5.993	15	-1706.700	3.823	2.880	4.553
16	-183.583	5.631	6.452	16	-1165.760	8.213	5.513	3.772	16	-522.498	3.378	3.134	16	-1828.390	1.834	0.848	4.267
17	-257.173	5.580	7.271	17	-1255.790	1.355	4.396	6.159	17	-591.451	4.232	4.630	17	-1846.460	2.909	3.267	4.979
18	-221.738	3.710	4.497	18	-1063.800	6.119	3.643	3.638	18	-385.259	5.533	3.572	18	-1666.520	4.156	3.549	2.897
19	-365.229	2.792	3.999	19	-1133.700	2.955	4.433	3.682	19	-514.784	2.925	4.516	19	-1861.160	2.828	4.405	4.643
20	-284.270	3.885	4.677	20	-1102.530	4.189	6.804	4.622	20	-487.103	3.237	3.272	20	-1722.310	3.045	3.208	5.280
21	-223.911	4.122	6.704	21	-1246.940	3.332	3.103	4.230	21	-513.189	4.360	3.671	21	-2369.560	3.319	1.666	4.699
22	-269.695	4.332	5.298	22	-1203.710	4.306	3.614	3.731	22	-473.154	6.342	3.762	22	-2147.720	2.345	2.801	5.480
23	-228.590	5.052	7.226	23	-1374.320	3.135	1.785	3.044	23	-656.394	3.202	5.379	23	-1730.780	6.118	5.865	5.392
24	-310.080	4.581	1.943	24	-1088.220	5.027	1.479	3.098	24	-463.230	4.409	5.307	24	-2041.710	0.960	3.005	6.359
25	-202.919	4.506	3.612	25	-1019.890	4.048	3.147	4.338	25	-491.914	3.616	5.194	25	-1751.230	5.304	5.022	6.776
26	-165.941	2.434	4.179	26	-894.609	7.065	4.125	4.253	26	-576.134	2.750	4.482	26	-1854.610	2.994	3.661	4.477
27	-175.044	3.850	2.053	27	-1056.690	6.292	5.867	7.192	27	-477.626	4.034	2.903	27	-1636.810	3.142	3.405	6.038
28	-259.336	3.075	3.553	28	-1080.170	3.406	3.899	4.776	28	-557.000	2.806	2.905	28	-1683.120	1.336	4.121	6.950
29	-220.121	4.385	5.459	29	-941.284	8.544	4.861	1.869	29	-503.420	4.409	6.449	29	-1685.020	6.010	7.773	9.566
30	-256.945	3.160	4.065	30	-1107.930	1.766	4.282	7.719	30	-491.015	3.21	3.347	30	-2001.570	6.635	2.391	3.972

Figura 25. Mecanismo geral da catálise da serinoprotease (HEDSTROM, 2002).

Tabela 6. Resultados dos 30 confôrmeros obtidos pelo docking da G0-Iso, G1-Iso, G0Pq e G1-Pq no programa GOLD (Verdonk et al, 2003).

4.2.4. G0-Iso

Obtiveram-se menores distâncias para a C2 quando analisado o dendrímero de geração 0 contendo isoniazida (**Tabela 7**). Indicam-se, assim, que as chances do derivado sofrer hidrólise enzimática na periferia podem ser maiores em relação à C1 (carbonila próxima ao dendrímero). Os confôrmeros 24 e 10 (**Figura 29**) ficaram entre os cinco melhores em relação ao *score* (valores de -310.080 e -297.450, respectivamente), corroborando com a hipótese de que a hidrólise enzimática pode acontecer em C2. As distâncias da Serina 221 e C2 foram de 1,943 Å e 2,482 Å, para os Dock 24 e 10, respectivamente.

Figura 26. Confôrmeros 24 (esquerda) e 10 (direita) resultantes das simulações de docking da G0-Iso na enzima 2H7C. As distâncias entre a Serina 221 e as carbonilas C2 estão destacadas em vermelho.

Tabela 7. Melhores resultados de docking da G0-Iso na enzima 2H7C. C1 e C2 estão destacadas em vermelho na estrutura.

Confôrmers	Distâncias (Å)		Score (ASP)
	C1	C2	
24	4,581	1.943	-310.080
10	3.791	2.482	-297.450

4.2.5. G1-Iso

Na análise do pró-fármaco G1-Iso, observa-se, na tabela 6, que os resultados dos 30 confôrmers apresentaram certa tendência à ação enzimática ocorrer em C1, uma vez que esta região apresentou maior número de resultados inferiores a 3 Å. Assim, conforme dados apresentados na tabela 8, o confômero 17 (**Figura 30**), está entre os cinco melhores em relação ao score (valor de 1255,790), cuja carbonila com menor distância foi a C1 (1,355 Å). Já os confômeros 7 e 2 (**Figura 31**) estavam entre os dez melhores (score iguais a 1200,560 e -1174,380, respectivamente). Nestes dois últimos confôrmers, as distâncias observadas para C1 foram de 4.298 Å e 1.706 Å, respectivamente.

Estimam-se, então, maiores chances da hidrólise enzimática ocorrer em C1.

Figura 27. Confômero 17 resultante das simulações de docking da G1-Iso na enzima 2H7C. A distância entre a Serina 221 e C1 está destacada em vermelho.

Figura 28. Confômeros 7 (esquerda) e 2 resultantes das simulações de docking da G1Iso na enzima 2H7C. As distâncias entre a Serina 221 e C1 estão destacadas em vermelho.

Tabela 8. Resultados obtidos pelo docking da G1-Iso no programa GOLD (Verdonk et al, 2003). As carbonilas C1 e C2 estão destacadas em vermelho.

Confôrmers	Distâncias (Å)			Score (ASP)
	C1	C2	C3	
7	4.298	1.292	2.964	-1200.560
17	1.355	4.396	6.159	-1255.790
2	1.706	4.025	6.166	-1174.380

4.2.6. G0-Pq

De forma geral, observaram-se 8 resultados menores que 3 Å tanto para C1, quanto para C2 (**Tabela 6**). Porém, entre os cinco melhores confôrmers obtidos, a carbonila C2 apresentou resultados ligeiramente melhores, como verificado no Quadro 6.

Os confôrmers 5 e 10 estão entre os cinco melhores em relação ao *score* (-717.754 e -575.206, respectivamente) e os confôrmers 4 e 11 ficaram entre os dez melhores neste *ranking* (*scores* de -540.484 e -575.206, respectivamente). Com base somente nestes achados, existe, portanto, maior possibilidade de C2 periférica sofrer hidrólise enzimática em comparação com a C1.

Tabela 9. Resultados obtidos pelo docking da G0-primaquina no programa GOLD (Verdonk et al, 2003)

Confôrmeros	Distâncias (Å)		Score (ASP)
	C1	C2	
4	4.222	1.259	-540.484
10	3.715	1.490	-575.206
5	1.832	3.389	-717.754
11	2.478	2.068	-528.367

--	--	--

4.2.7. G1-Pq

Observando-se os resultados gerados para o pró-fármaco G1-Pq na **Tabela 6**, é possível notar a relevante diferença entre C1, C2 e C3. Para C1 obteve-se 16 resultados desejáveis, sendo o maior valor o do confômero 26 (2,994 Å) e menor o do confômero 24 (0,960 Å). Enquanto para C2, entre os 9 resultados mais interessantes, houve variação entre 0,848 Å (confômero 16) a 2,880 Å (confômero 15). Apenas dois resultados de C3 mostraram-se satisfatórios, o do confômero 12 (2,932 Å) e do confômero 18 (2,897 Å). Importante mencionar que essa proporção foi mantida na **Tabela 10**, no qual foram selecionadas as quatro melhores poses. Os confômeros 3 e 12, cujas distâncias foram de 1,052 Å e 1,114 Å, respectivamente, ficaram entre os cinco melhores no *ranking* do *score* (valores calculados iguais a -2312,700 e 2117,130, respectivamente) e o 24, de distância 0,960 Å, entre as dez melhores (valor de *score* calculado foi de -2041,710). Dessa forma, acredita-se que a hidrólise enzimática, possivelmente, ocorrerá em C1.

Tabela 10. Resultados obtidos pelo docking da G1-Pq no programa GOLD (Verdonk et al, 2003)

Confômero	Distâncias (Å)	Score (ASP)

	C1	C2	C3	
16	1.834	0.848	4.267	-1828.390
24	0.960	3.005	6.359	-2041.710
3	1.052	3.749	3.731	-2312.700
12	5.071	1.114	2.932	-2117.130

4.2.8. Resultados AutoDock (Trott et al., 2010)

Com o intuito de validar e comparar os dados obtidos no Gold, utilizou-se o programa AutoDock. Conforme ilustra a **Tabela 11**, observaram-se que nenhum dos resultados das distâncias de C1 e C2 em relação à Serina 221 foram próximo de 3 Å. Todos foram superiores a 12 Å. Logo, estes dados mostraram que não houve interação entre qualquer uma das estruturas com o sítio ativo. Provavelmente, não aconteceu a acomodação do ligante na enzima. Posteriores investigações utilizando outros padrões de parametrização serão, portanto, necessárias.

Tabela 11. Resultados das simulações de docking resultantes do programa AutoDock (Trott et al., 2010).

Estrutura	Confômero	Carbonila mais próxima da Serina 221	Distância (Å)	Affinity (kcal/mol)
G0-Iso	19	C2	12.687	-5.6

	13	C2	12.847	-5.8
	4	C1	14.340	-6.8
G1-Iso	12	C2	13.643	-5.8
	7	C3	14.180	-5.9
	10	C3	14.225	-5.8
	1	C2	14.335	-9.1
G0-Pq	3	C2	14.555	-8.5
	2	C2	14.370	-8.6
	3	C3	13.945	-5.8
G1-Pq	4	C3	14.079	-5.8
	2	C3	14.165	-6.0

4.2.9. Simulações de *docking* molecular entre a Clso-Suc e a catalase-peroxidase

O objetivo desta etapa do trabalho foi analisar modo de interação das Clso-Suc, chamadas aqui de Iso_Cic5 para a de 5 membros e Iso_Cic6 para a de 6 membros, em comparação com a isoniazida, na enzima Katg, catalase peroxidase envolvida no mecanismo de ação da isoniazida. Alemjava-se entender se estes derivados ciclizados poderiam ter ação *per se*.

Considerando a impossibilidade da realização do re-*docking*, uma vez que a enzima escolhida não estava cristalografada com um ligante, fizeram-se as avaliações dos resultados computacionais em relação às interações com aminoácidos da proteína, expressos como distâncias médias (em Å) (**Tabela 12**).

Tabela 12. Resultados obtidos no programa Gold (Verdonk et al, 2003) para as funções de scores ChemScore e ASP e as distâncias médias (em Å) entre os ligantes e o ferro do grupo heme.

ISONIAZIDA				ISO_CIC5				ISO_CIC6			
Dock	ChemScore	ASP	Dist. média HEME	Dock	ChemScore	ASP	Dist. média HEME	Dock	ChemScore	ASP	Dist. média HEME
1	17.087	16.895	9.914	1	10.640	11.408	11.449	1	6.477	4.625	10.715
2	13.136	14.292	10.143	2	11.285	9.366	11.709	2	9.853	6.412	12.874
3	13.232	11.696	11.589	3	11.285	9.366	11.709	3	6.782	8.564	7.027
4	16.713	16.762	9.680	4	8.407	12.656	10.757	4	6.847	5.864	12.978
5	17.027	17.202	9.776	5	8.193	10.419	10.305	5	9.419	12.060	12.997
6	15.887	15.060	erro	6	9.820	13.586	9.500	6	8.670	5.524	11.012
7	14.764	15.334	9.111	7	10.387	13.600	10.655	7	8.599	10.018	13.369
8	17.705	14.758	9.049	8	7.010	10.444	12.358	8	8.302	7.416	10.779
9	16.757	17.193	9.896	9	10.564	13.084	9.879	9	4.238	4.339	10.390
10	14.459	11.118	14.442	10	36.883	9.279	8.756	10	8.670	5.524	11.012
11	17.126	16.891	9.926	11	67.109	9.874	9.220	11	0.151	-2.663	9.672
12	16.909	16.336	9.774	12	10.837	10.646	12.192	12	9.293	12.060	12.998
13	17.843	15.191	9.137	13	10.934	11.693	9.809	13	6.993	1.603	10.700
14	13.777	15.398	9.623	14	11.629	12.870	12.579	14	9.362	11.421	13.019
15	14.608	13.920	10.162	15	8.347	10.090	12.390	15	8.670	5.524	11.012
16	17.800	15.068	9.074	16	8.735	11.698	10.656	16	7.987	6.948	13.477
17	12.514	14.482	8.988	17	11.771	14.870	10.561	17	4.238	4.339	10.390
18	16.757	17.193	9.896	18	8.376	12.763	10.453	18	-2.490	-3.427	9.866
19	16.875	14.604	10.341	19	8.775	12.801	10.677	19	7.320	11.139	12.092
20	14.619	12.970	11.869	20	11.164	12.728	11.949	20	9.311	9.964	12.764
21	14.722	13.312	10.486	21	8.111	12.444	9.464	21	8.670	5.524	11.012
22	14.207	13.774	10.771	22	9.853	14.282	11.311	22	9.382	11.421	13.045
23	16.909	16.336	9.774	23	8.703	12.486	10.639	23	8.670	5.524	11.012
24	13.232	11.696	11.589	24	14.467	6.338	12.916	24	0.026	-3.825	6.728
25	12.897	14.560	8.096	25	9.611	14.221	9.491	25	6.108	-14.040	9.658
26	12.668	10.633	11.774	26	12.376	15.100	10.505	26	7.609	10.985	12.291
27	14.608	13.920	10.162	27	7.286	11.856	11.957	27	8.257	5.686	13.145
28	14.592	12.372	11.654	28	11.784	13.710	11.702	28	4.844	8.798	8.767
29	13.608	13.666	9.921	29	7.406	10.506	11.766	29	9.286	4.679	13.268
30	17.126	16.891	9.926	30	10.825	10.646	12.192	30	11.128	15.404	11.513

Pode-se constatar que a distância média em relação ao ferro do grupo heme foi mais próxima entre a isoniazida e a Iso_Cic5 (10,226 e 10,984,

respectivamente, **Tabela 13**), apesar de Iso_Cic6 não ter apresentado resultado tão diferente (11,319, **Tabela 13**).

Tabela 13. Distância média das estruturas em relação ao ferro do grupo heme (em Å).

	Isoniazida	Iso_Cic5	Iso_Cic6
Distância média (Å)	10,226	10,984	11,319

As análises dos 30 confôrmeros provenientes das simulações de *docking* molecular com a isoniazida mostrou que o aminoácido ASP137 parece ser interessante para a interação com a Katg. Ademais, de modo geral, a Iso_Cic6 apresentou mais interações em comum com a isoniazida, além de um de seus confôrmeros apresentarem uma interação a mais, com o aminoácido VAL230, em relação à isoniazida (Figura 2).

Foram poucas as interações dos confôrmeros de isoniazida, Iso_Cic5 e Iso_Cic6 com os aminoácidos THR314, ALA139 e ALA281. Ademais, apesar de não se verificar para a isoniazida, com os aminoácidos SER315, GLU233 e ASN231 paracem ser importantes para Iso_Cic5 e Iso_Cic6. Por outro lado, sugerem-se que PRO136 e ARG104 são interessantes para a isoniazida. Já LEU227 teve quantidade de interações com a isoniazida semelhantes à Iso_Cic5 e Iso_Cic6. Todos estes dados estão apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Principais aminoácidos envolvidos nas interação de Iso_Cic5 e Iso_Cic6 com o alvo molecular, comparados com a isoniazida.

Em destaque na **Tabela15**, nota-se a importância da PRO232 e da LEU205, tanto para a isoniazida, quanto para Iso_Cic5 e Iso_Cic6. Estes aminácidos parecem, portanto, serem interessantes para a interação ligandereceptor. Os valores encontrados foram de 10, 23 e 11, para PRO232 e

isoniazida, Iso_Cic5 e Iso_Cic6, respectivamente. Já em relação à LEU205, observaram-se 11, 17 e 11 interações com isoniazida, Iso_Cic5 e Iso_Cic6, respectivamente.

Tabela 15. Comparação entre quantidade de interações das estruturas com os aminoácidos.

Aminoácido	Quantidade de interações (total = 30 poses de cada estrutura)		
	Isoniazida	Iso_Cic5	Iso_Cic6
PRO136	7	0	0
PRO232	10	23	11
ASP137	28	4	5
LEU205	11	17	11
LEU227	5	6	2
ARG104	13	0	1

SER315	8	15	18
ASN231	3	1	15
THR314	3	0	1
ALA139	1	0	0
ALA281	1	1	3
GLU233	1	10	2
H ₂ O	5	8	2
HEME	5	13	12
VAL230	0	0	1

As melhores poses da isoniazida, Iso_Cic5 e Iso_Cic6 (**Figuras 32, 33 e 34**, respectivamente) foram escolhidas considerando as os aminoácidos ASP137, PRO232 e LEU205, conforme importância discutida previamente.

Figura 29. Dock (número 2) da isoniazida na enzima PDB 1SJ2.

Figura 31. Dock (número 17) da Iso_Cic5 na enzima 1SJ2.

Figura 30. Dock (número 17) da Iso_Cic6 na enzima 1SJ2.

4.3. ESTUDOS DE ESTABILIDADE QUÍMICA DA Iso-Suc (NAJLAH et al, 2006)

Esta etapa do projeto teve a colaboração do aluno de Iniciação Científica José Carlos V. L. dos Reis.

4.3.1. Desenvolvimento do método analítico

O desenvolvimento do método teve início com a escolha de uma coluna cromatográfica mais próxima daquela descrita pela farmacopeia brasileira. Para tanto, foram selecionadas colunas de Octadecilsilano (5 μ m), tanto de 250mm x 4,6 mm, quanto de 150 mm x 4,6 mm de marcas distintas.

Os testes foram realizados com amostras de isoniazida de concentração igual a $1,82 \times 10^{-3}$ M, preparadas em fase móvel conforme descrito na Farmacopeia, tomando como parâmetros de aceitação o Fator de cauda, número de pratos teóricos, pureza dos picos e tempo de retenção. A média das cinco análises, para cada coluna, estão apresentadas na **Tabela 16**.

Tabela 16. Colunas cromatográficas testadas.

Coluna	Fator de Cauda	Nº pratos teóricos	Pureza do pico	Tempo de retenção (min)
C18 - MERK 250mm	2,38	2289,23	puro	3,88
C18 - LICHROSPHERE 250mm	1,95	2283,33	puro	7,81
C18 - ACE 150mm	2,48	691,47	puro	3,59
C18 - XBridge 150mm	1,31	4679,87	puro	3,37

Com base nos resultados apresentados na **Tabela 16**, a coluna C18 – Xbridge (5µm) –150 mm x 4,6 mm foi escolhida como a mais adequada dentre as verificadas, uma vez que apresentou o menor fator de cauda e maior número de pratos teóricos. Esses dados indicam maior eficiência na separação dos componentes de uma mistura.

A otimização do método prosseguiu com a determinação do pH da fase móvel a ser empregada. Tal determinação teve como objetivo encontrar um valor onde a maioria das espécies analisadas encontrava-se eletricamente neutra, visando uma melhor interação com a coluna cromatográfica. Para tanto, fora realizada a determinação do pKa das espécies Clso-suc, Iso-suc e isoniazida a partir de simulações com o software *MarvinSketch*.

Com base nos resultados apresentados acima, tanto a Clso-suc quanto a isoniazida encontram-se, predominantemente, na forma molecular no valor de pH de 6,9, conforme proposto pela metodologia inicial da Farmacopeia. Entretanto, a Iso-suc mostra-se carregada negativamente e, visando melhorar sua interação com a coluna cromatográfica, foram realizados testes adicionando 0,1% de trietilamina (TEA) ou 0,1% de ácido trifluoracético (TFA) à fase móvel.

Embora não tenham sido observadas variações significativas no tempo de retenção médio dos analitos, uma melhor simetria dos picos fora constatada com o emprego de 0,1% de TFA, sendo este, portanto, o componente acrescido a fase móvel.

A etapa seguinte de desenvolvimento do método envolveu a determinação da proporção de tampão fosfato e metanol que melhor permitia a separação dos analitos em questão. Como ponto de partida, foram feitas análises na proporção 95:5 (v/v), conforme descrito na farmacopeia. Com o objetivo de melhor separação dos picos de Iso-suc e isoniazida, foi necessário diminuir a proporção de solvente orgânico para 97,5:2,5 (v/v), para que fosse aumentada a interação destes analitos com a coluna. A média das cinco análises dos tempos de retenção obtidos, para cada proporção, estão apresentadas na **Tabela 17**.

Tabela 17. Determinação da proporção entre os solventes tampão fosfato e metanol.

Analito	Tempo de Retenção (min)	
	95:5 (v/v)	97,5:2,5 (v/v)
Clso-suc	4,952	6,610
Iso-suc	2,413	2,685
isoniazida	3,332	3,930

O planejamento do método teve continuidade com o aumento da temperatura do forno de ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) para o valor constante de 35°C , com os propósitos de se padronizar a temperatura de análise e melhorar em 0,76 a simetria dos picos. Sabe-se que o aumento de temperatura, dentro dos limites da coluna, favorece a interação dos analitos com a fase estacionária.

A penúltima etapa do desenvolvimento do método foi o ajuste do fluxo de fase móvel durante a análise. A escolha de se modificar o fluxo surgiu da necessidade em se aumentar os parâmetros de fator de cauda e número de pratos teóricos. Pretendeu-se, então, assegurar a manutenção destes valores acima dos mínimos ao longo de todo o estudo de estabilidade, uma vez que as numerosas análises poderiam desgastar a coluna e inviabilizar sua utilização durante o ensaio.

Para esta finalidade, foi escolhido trabalhar com um gradiente de fluxo de fase móvel, entretanto, por não se tratar de uma prática frequente, poucas referências foram encontradas acerca deste assunto, de modo que os testes foram realizados empiricamente e os ajustes foram sendo feitos a partir dos resultados gerados. Após serem realizados ensaios testando diversos gradientes

de fluxo, achou-se a melhor condição (relatada na **Tabela 18**). Esse gradiente de fluxo apresentou, quando comparado aos fluxos constantes de 0,8 mL/min e 1 mL/min, a melhor resolução dentre os gradientes testados (aumento médio de 0,53 em relação aos demais). Essa comparação pode ser observada na **Tabela 19**.

Tabela 18. Gradiente de fluxo escolhido.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)
0,01	0,6
2,0	0,8
5,0	1,0
6,0	1,3

Tabela 19. Comparação entre o fluxo constante e o gradiente de fluxo.

Analito	Parâmetro	Fluxo		
		0,8 mL/min	1,0 mL/min	Gradiente
Clso-suc	Tempo de retenção	7,639	6,234	5,828
	Fator de cauda	1,701	1,203	1,197
	Número de pratos teóricos	4681,051	6690,351	13489,695
Iso-suc	Tempo de retenção	3,175	2,612	3,190
	Fator de cauda	1,380	1,278	1,315
	Número de pratos teóricos	3206,873	3683,531	4330,149
Isoniazida	Tempo de retenção	4,711	3,760	4,237
	Fator de cauda	1,589	1,362	1,364

	Número de pratos teóricos	4762,223	5609,857	6612,388
--	---------------------------	----------	----------	----------

Por fim, a última etapa de desenvolvimento do método envolveu o ajuste dos volumes de amostra e de injeção, com o propósito de se adequar a quantidade de analito que chega ao detector dentro limites de detecção. Para tanto, fora necessário, primeiramente, determinar qual a concentração de Clsosuc a ser empregada no ensaio de estabilidade.

Por uma questão de praticidade e de redução da incerteza atrelada a pesagem, a massa inicial de Clso-suc fora estabelecida como 6 mg, os quais foram dissolvidos em 15 mL de fase móvel, resultando em uma concentração molar de $1,82 \times 10^{-3}$ mol/L. Uma vez determinada a concentração inicial e, conhecendo-se o comportamento do detector disponível, foi estabelecido 1 mL como volume de amostra no interior do vial (~2 mL) e 60 µL como volume de injeção para respeitar o limite de detecção do equipamento.

4.3.2. Estudos de estabilidade química

As informações principais dos resultados dos estudos de estabilidade química de Clso-Suc mostraram que Clso-Suc pode se converter Iso-Suc. Por outro lado, a quebra da ligação entre o ácido succínico e a isoniazida praticamente não foi observada, uma vez que praticamente não há sinais correspondentes desta nos cromatogramas. Isso pode ser explicado pelo anel heterocíclico pirrolidiona da Clso-suc, o qual é menos estável, quando comparado à cetohidrazona da Iso-suc (CLAYDEN et al, 2012).

Soluções tampão pH 1,2 e 6,0

Os experimentos demonstraram que o anel cíclico da Clso-Suc de manteve relativamente manteve estável nas faixas de soluções tampões de pH de 1,2 e 6,0 durante 24 horas, mesmo sob agitação e aquecimento a 37 °C, uma vez que o sinal da Clso-Suc foi menor do que os outros dois pH. Tal constatação pode ser vantajosa pensando na administração oral do pró-fármaco, uma vez que não haverá hidrólise durante o trânsito gastrointestinal.

Ademais, observa-se uma variação irregular da área de Iso-suc na primeira hora de ensaio, o que reflete a dificuldade de se quantificar analitos em concentrações muito próximas do limite de detecção do equipamento utilizado. As **Figuras 35 e 36** foram feitas com base nos dados das Tabelas **20 e 21**.

Tabela 20. Média das áreas de Clso-suc e Iso-suc ao longo do ensaio em solução tampão pH 1,2.

Número da Amostra	Área média de Clso-suc (unidades de área)	Área média de Iso-suc (unidades de área)
T0	24282334	0
T1	25210251	7258
T2	23261969	0
T3	25494918	316070
T4	22601230	280079
T5	14103048	0
T6	18649172	128193
T7	17647228	167130
T8	19940223	612957
T9	19144319	710516
T10	18768167	837559
T11	15489071	4173326
T12	13917164	4293758

Figura 32. Gráfico da variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em solução tampão pH 1,2.

Tabela 21. Média das áreas de Clso-suc e Iso-suc ao longo do ensaio em solução tampão pH 6,0.

Número da Amostra	Área média de Clso-suc (unidades de área)	Área média de Iso-suc (unidades de área)
T0	14668571	1830878
T1	12821106	0
T2	15975284	231857
T3	15467310	12028
T4	15566218	272838
T5	15819410	526685
T6	13181978	143555
T7	15204397	867150
T8	13394802	767540
T9	14973192	1458216

T10	14872890	1191123
T11	10765658	8254535
T12	9746752	8831036

Figura 33. Gráfico da variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em solução tampão pH 6,0.

Considerando os ensaios com Clso-Suc em solução tampão pH 1,2, ao se comparar os cromatogramas do tempo 0 (T0) com o tempo 24 horas (T13), é possível notar o aumento da amplitude do sinal da Iso-Suc (tempo de retenção próximo de 3,371 minutos, área sob a curva inicial de 0 e final de 4293758), a diminuição de Clso-Suc (tempo de retenção próximo de 6,525 minutos, área sob a curva inicial de 24282334 e final de 13917164) (**Cromatogramas 1 e 2**).

Cromatograma 1. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 1,2 (T0). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.

Cromatograma 3. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 1,2 (T13). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.

Em relação à solução tampão pH 6,0, do mesmo modo que em pH 1,2, ao se comparar os cromatogramas do tempo 0 (T0) com o tempo 24 horas (T12), verifica-se o aumento da amplitude do sinal da Iso-Suc (tempo de retenção de próximo de 3,345 minutos, área sob a curva inicial de 1830878 e final de 8831036), a diminuição de Cliso-Suc (tempo de retenção de 6,525 minutos, área sob a curva inicial de 14668571 e final de 9746752) (**Cromatogramas 3 e 4**).

Cromatograma 2. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 6,0 (T0). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.

Cromatograma 4. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 6,0 (T13). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.

pH 7,4 e 8,5

Assim como nos experimentos com soluções pH 1,2 e 6,0, os experimentos em pH 7,4 e 8,5 demonstraram que a ligação entre a isoniazida e o transportador se manteve estável em 24 horas, uma vez que não fora observado sinal de isoniazida dentro do limite de detecção do equipamento. Por

outro lado, é possível observar que, tanto em pH 7,4, quanto 8,5 ocorre a conversão de Clso-Suc para Iso-Suc, evidenciado pela queda na média das áreas sob a curva de Clso-suc e aumento de Iso-suc (**Figura 34 e Figura 35**). Importante mencionar que os pH 7,4 e 8,5 representam, respectivamente, o sangue e as partes distais do intestino.

Tabela 22. Média das áreas de Clso-suc e Iso-Suc ao longo do ensaio em pH 7,4.

Número da Amostra	Área média de Clso-suc (unidades de área)	Área média de Iso-suc (unidades de área)
T0	26200865	1793247
T1	25900463	615393
T2	26433645	1071884
T3	24442601	973887
T4	24934870	1780307
T5	24953983	2141859
T6	24345718	2386693
T7	22158901	2798471
T8	20529808	3221222
T9	19915539	3843329
T10	16727201	3448101
T11	9543599	14317749
T12	9099986	14608956
T13	7523524	15993041

Figura 34. Gráfico da variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em solução tampão pH 7,4.

Tabela 23. Média das áreas de Clso-suc e Iso-Suc ao longo do ensaio em pH 8,5.

Tempo de coleta da mostra	Área média de Clsosuc (unidades de área)	Área média de Iso-suc (unidades de área)
T0	16604510	1366383
T1	17345057	1324008
T2	16210976	714749
T3	16149613	1046567
T4	17501925	1720601
T5	18118573	2304926
T6	17704015	2601910
T7	15529743	3028890
T8	14601338	3664896
T9	14144228	4614864

T10	14361243	5490075
T11	5816111	19335696
T12	5047512	18611643
T13	3223828	7523524

Figura 35. Gráfico da variação da área do pró-fármaco ao longo de 24 horas em solução tampão pH 8,5.

A liberação mais eficientes nesses meios podem ser demonstradas através do coeficiente linear da curva da Iso-Suc que para o pH 7,4 é de 1×10^6 e para o pH 8,5 é de 2×10^6 . Esses valores são 2 vezes e 4 vezes maior que o pH 6. Os **cromatogramas 5 e 6** referentes ao pH 7,4 e os **cromatogramas 7 e 8** referente ao pH 8,5 mostram que após 24 horas o pico que representa a ClsoSuc já tem a sua porcentagem em área muito menor quando comparado ao T0, antes do início da incubação. No pH 7,4 a média da área correspondente ao IsoSuc (tempo de retenção 3,116 minutos) sobe de 1793247 no T0 para 15993041 no último tempo

de coleta (T13). A média da área da Clso-Suc (tempo de retenção 5,704 minutos) cai de 26200865 no T0 para 7523524 no T13. Já no pH 8,5, o a média da área da Iso-Suc sobe de 1366383 para 7523524 (T0 e T13) e a média da área de Clso-Suc cai de 16604510 para 3223828).

Cromatograma 5. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 7,4 (T0). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.

Cromatograma 6. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 7,4 (T13). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.

Cromatograma 7. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 8,5 (T0). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.

Cromatograma 8. Cromatograma resultante do estudo de estabilidade em pH 8,5 (T13). Condições cromatográficas: Solvente A (0,1% TFA/Tampão fosfato pH 6,9, v/v); solvente B (Metanol). Proporção de solvente 95% de A e 5% de B. Gradiente de fluxo de 0,6 a 1,3 mL/min por 10 minutos. Comprimento de onda: 261 nm.

É importante destacar que, na condição com solução tampão pH 7,4, apareceu um pequeno pico referente á isoniazida (tempo de retenção de 3,928)

indicando uma pequena liberação do ativo, mesmo que pequena quando comparada à Iso-Suc (tempo de retenção 5,324). Já em solução tampão de pH 8,5, os picos mostraram-se mais assimétricos, característica relacionada com os valores de pKa dos hidrogênios ligados ao nitrogênio das moléculas, os quais são de 8,6 (nitrogênio 8, **Figura 36**, a esquerda) na Clso-Suc, considerando a de 5 membros e 9,0 para a Iso-Suc (nitrogênio 5, **Figura 36**, a direita). Assim, estas moléculas encontram-se nas formas ionizadas e não ionizadas, aumentando o fator de cauda, distorcendo o pico.

Figura 36. Estruturas da Clso-Suc (esquerda) e Iso-Suc (direita).

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Pelos resultados de infravermelho, RMN de ^1H e ^{13}C , possivelmente, sintetizaram-se os intermediários Iso-Suc, Pq-suc, bem como os pró-fármacos dendriméricos de G0 (G0-Iso e G0-Pq) e de G1 (G1-Iso e G1-Pq). A análise da espectroscopia de massas revelou a presença de um intermediário de síntese Clso-Suc que pode estar ligada ao uso do EDC e DMAP para as sínteses EDC e DMAP. Foi identificado o potencial como pró-fármaco desse intermediário e usou-se então a metodologia analítica desenvolvida para os estudos de liberação. Esses ensaios revelaram que o pró-fármaco é consideravelmente mais estável em meio ácido (pH's 1,2 e 6,0) e libera com uma taxa maior em meios neutros/básicos (pH 7,4 e 8,5). Esses dados foram importantes para indicar uma possível estabilidade oral dessa molécula. Por fim, foram analisados via estudos *in silico* a sua inibição direta no alvo da izonizida que revelou que é possível prever a sua ligação, mas não a sua atividade biológica. Para comprovar a atividade biológica *per si* da Clso-Suc serão necessários estudos da sua atividade biológica que já estão em processo de execução. Ainda com relação

aos estudos computacionais, a carbonila C2 do dendrímero G0-Iso e G0-Pq, parece ser a mais interessante para a ação enzimática. Já para o pró-fármaco G1-Iso e G1-Pq, a carbonila C1 foi a mais promissora.

6. REFERÊNCIAS

ABDULLA, M. H.; RUELAS, D. S.; WOLFF, B.; SNEDECOR, J.; LIM, K.; XU, F.; RENSLO, A.R.; WILLIAMS, J.; CAFFREY, C.R. Drug discovery for schistosomiasis: Hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.3, n.7, p. 1-14, 2009.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira, volume 2**. 5ª Ed. Brasília, 2010.

ARANTES, G.M. Uma perspectiva computacional sobre catálise enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 377-383, 2008.

ARAUJO, R.V.V.; SANTOS, S.S.; FERREIRA, E.I.; GIARROLA, J. New Advances in General Biomedical Applications of PAMAM Dendrimers. **Molecules**, v. 23, p. 1, 2018.

BAIRD, J.K; LACY, M.D; BASRI, H; BARCUS, M.J; MAGUIRE, J.D; BANGS, M.J; GRAMZINSKI, R; SISMADI, P; KRISIN-LING, J; WIADY, I; KUSUMANINGSIH, M; JONES, T.R; FRYAUFF, D.J; HOFFMAN, S.L. Randomized, parallel placebocontrolled trial of primaquine for malaria prophylaxis in Papua, Indonesia. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p.1990-1997, 2001.

BENCHARIT, S.; EDWARDS, C.C.; MORTON, C.L.; HOWARD-WILLIAMS, E.L.; KUHN, P.; POTTER, P.M.; REDINBO, M.R. Multisite promiscuity in the processing of endogenous substrates by human carboxylesterase 1. **Journal of molecular biology**, v. 363, n. 1, p. 201-214, 2006.

BERTRAND, T.; EADY, N.A.J.; JONES, J.N.; JESMIN.; NAGY, J.M.; GREGOIRE, B.J.; RAVEN, E.L.; BROWN, K.A. Crystal Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 38991-38999, 2004.

BIRD, I. M. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. **Department of Biochemistry, University of Edinburgh**, v. 299, p. 783-787, 1989.

BOAS, U.; HEEGAARD, P.M.H. Dendrimers in drug research. **Chemical Society Reviews**, v. 33, n. 1, p. 43-63, 2004.

BOECHAT, N., MAGALHÃES, J. Era uma vez... Doenças Negligenciadas. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 195-196, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Malária: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Brasília, DF, 2019.

CATTAMANCHI, A.; DANTES, R.B.; METCALFE, J.Z.; JARLSBERG, L.G.; GRINSDALE, J.; KAWAMURA, L.M.; OSMOND, D.; HOPEWELL, P.C.; NAHID, P. Tuberculosis: clinical characteristics and treatment outcomes of patients with isoniazid-monoresistant tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p.179–185, 2009.

CHAUDHARI, S.S.; AKAMANCHI, K.G. Thionyl Chloride-Benzotriazole in Methylene Chloride: A Convenient Solution for Conversion of Alcohols and Carboxylic Acids Expeditiously into Alkyl Chlorides and Acid Chlorides by Simple Titration. **Synlett**, v.11, p.1763-1765, 1999.

CHENG, Y.; XU, Z.; MA, M.; XU, T.; Dendrimers as Drug Carriers: Applications in Different Routes of Drug Administration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.97, p.123-143, 2008.

CHUNG, M.; SILVA, A.; CASTRO, L.F.; GUILDO, R.; NASSUTE, J.C. Advances in prodrug design. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.5, p.893-914, 2005.

CLAYDEN, J., GREEVES, N., WARREN, S. Organic Chemistry, 2nd Edition, **Ed. Oxford University Press**, 2012.

CROFT, S. L. Neglected tropical diseases in the genomics era: re-evaluating the impact of new drugs and mass drug administration. **Genome Biology**, v.17, p.46, 2016.

DA SILVA SANTOS, S.; FERREIRA, E. I.; GIAROLLA, J. Dendrimer prodrugs.

Molecules, v. 21, n. 6, p. 686, 2016.

Das GUPTA, R.; KRAUSE-IHLE, T.; BERGMANN, B.; MÜLLER, I.B.;

KHOMUTOV, A.R.; MÜLLER, S.; WALTER, R.D.; LÜERSEN, K. 3-

Aminooxy1aminopropane and derivatives have an antiproliferative effect on cultured *Plasmodium falciparum* by decreasing intracellular polyamine concentrations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.29, p. 2857–2864, 2005.

De ASSIS, J.V.; TEIXEIRA, M.G.; SOARES, C.G.P.; LOPES, J.F.; CARVALHO, G.S.L.; LOURENÇO, M.C.S.; ALMEIDA, M.V.; ALMEIDA, W.B.; FERNANDES, S.A. Experimental and theoretical NMR determination of isoniazid and sodium psulfonatocalix[n]arenes inclusion complexes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.47, p. 539-548, 2012.

DIAS, A.P.; SANTOS, S.S; SILVA, J.V.; PARISE-FILHO, R.; FERREIRA, E.I.; SEOUD, O.E.; GIAROLLA, J. Dendrimers in the context of nanomedicine.

International Journal of Pharmaceutics, v. 573, 2020.

ENGELS, D. Neglected tropical diseases in the Sustainable Development Goals. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 223-224, 2016.

FAKUNLE, E. S.; LORING, J. F. Ethnically diverse pluripotent stem cells for drug development. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, p. 709–716, 2012.

FENG, X.; YUAN, Y.J.; WU, J.C. Synthesis and Evaluation of Water-Soluble Paclitaxel Prodrugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.12, p.33013303, 2002.

FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 41, p.155-179, 2005.

FERREIRA, L.G.; SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FRECHET, J. M. J.; TOMALIA, D. A. **Dendrimers and other dendritic polymers**. John Wiley and Sons Inc., 2001.

GIAROLLA, J.; FERREIRA, E.I. Drug Design for Neglected Disease in Brazil. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 219-241, 2015.

Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.

Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. p. 7. Disponível em:
<<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274453/9789241565646eng.pdf>>
Acesso em: 24 jan 2019.

GRAYSON, S. M.; FRECHET, J. M. J. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 12, p. 3819-3868, 2001.

GREENALL, M.; KUNII, O.; THOMSON, K.; BANGERTA, R.; NATHANA, O. Reaching vulnerable populations: lessons from the Global Fund to fight AIDS, tuberculosis and malaria. **Bull World Health Organization**, v. 95, p. 159-161, 2017.

GRAYSON, S.M.; FRÉCHET, J.M.J. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to application. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 3819-3867, 2001.

Guidelines for the treatment of malaria 2015. Geneva: World Health Organization; 2015. p 96 e 97, 250 - 253. Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf?sequence=1> Acesso em: 18 jan 2019.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: applications to infectious diseases. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 81–98, 2010.

HAMADA, Y. Recent progress in prodrug design strategies based on generally applicable modifications. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, p.1627-1632, 2017.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.

HERNÁNDEZ-SANTOYO, A.; TENORIO-BARAJAS, A. Y.; ALTUZAR, V.; VIVANCO-CID, H.; MENDOZA-BARRERA, C. Protein-protein and protein-ligand docking. In: OGAWA, T. Protein engineering – technology and application.

Croácia: InTech, cap. 3, p. 63-81, 2013.

HORSBURGH R., C. Robert; BARRY III, C. E.; LANGE, C. Treatment of tuberculosis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 22, p. 2149-2160, 2015.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, M. B.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 10, p. 1018–1027, 2007.

HOTEZ, P. J.; FUJIWARA, R. T. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. **Microbes and Infection**, v. 16, p. 601-606, 2014.

JIANG, L.; LAI, L. CH···O hydrogen bonds at protein-protein interfaces. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37732-37740, 2002.

KEALEY, A.; SMITH, R. Neglected tropical disease: Infection, modeling and control. **Journal of Health Care for the Poor and Underserved**, v. 21, p. 53-69, 2010.

KESHARWANI, P.; JAIN, K.; JAIN, N. K. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 268-307, 2014.

KETATA, W.; REKIK, W. K.; AYADI, H.; KAMMOUN, S. Les tuberculoses extrapulmonaires. **Revue de Pneumologie Clinique**, v. 71, p. 83–92, 2015. KIM, Y.; PARK, E.J.; NA, D.H. Recent progress in dendrimer-based nanomedicine development. **Archives of Pharmacal Research**, v. 41, p. 571582, 2018.

La-SCALEA, M. A.; MENEZES, C. M. S.; MATSUTAMI, G.C. ; POLLI, M.C. ; SERRANO, H.P. ; FERREIRA, E.I. Molecular modeling of the voltammetric oxidation at a glassy carbon electrode of the antimalarial drug primaquine and its prodrugs succinylprimaquine and maleylprimaquine. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 5103–5111, 2006.

LIM, L. E.; VILCHÈZE, C.; NG, C.; JACOBS, W. R.; RAMÓN-GARCIA, S.; THOMPSON, C. J. Anthelmintic avermectins kill Mycobacterium tuberculosis, including multidrug-resistant clinical strains. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 1040-1046, 2013.

MAIOROV, V. N.; CRIPPEN, G. M. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, n. 2, p. 625-634, 1994.

MARTINS-MELO, F. R. ; ROGERLANDIO, F.; RAMOS-JR, A.N. ; ALENCAR, C.H.; HEUKELBACH, J. Trends and spatial patterns of mortality related to neglected tropical diseases in Brazil. **Parasite Epidemiology and Control**, v.1, n. 2, p. 56–65, 2016.

MOLYNEUX, D. H.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D. Neglected tropical diseases: progress towards addressing the chronic pandemic. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 312-325, 2017.

MOONEY, A.; CORRY, A. J.; CLIODHNA, N. R.; MAHGOUB, T., SULLIVAN, D. O.; DONOVAN, N. O.; CROWN, J.; VARUGHESE, S.; DRAPER, S. M.; RAI, D. K.; KENNY, P. T. M. Synthesis, characterisation and biological evaluation of N(ferrocenyl)naphthoyl amino acid esters as anticancer agents. **Dalton Transactions**, v. 35, p. 8228-8239, 2010.

MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS, A. L.; MCDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. Neglected disease research and development: How much are we really spending? **PLoS Medicine**, v. 6, n. 2, p. 0137–0146, 2009.

MORI, G.; CHIARELLI, L. R.; RICCARDI, G.; PASCA, M. R. New prodrugs against tuberculosis. **Drug Discovery Today**, v. 22, p. 519–525, 2017.

MÜLLER, I. B.; WU, F.; BERGMANN, B.; KNÖCKEL, J.; WALTER, R. D.; GEHRING, H.; WRENGER, C. Poisoning pyridoxal 5-phosphate-dependent enzymes: a new strategy to target the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **PLoS One**, v. 4, p.1–9, 2009.

NAJLAH, M.; FREEMAN, S.; ATTWOOD, D.; D'EMANUELE, A. Synthesis, characterization and stability of dendrimer prodrugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v.308, p.175-182, 2006.

NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. **Angewandte Chemie International**, v. 553, n. 7, p. 12–14, 1978.

NDJONKA, D.; BERGMANN, B.; AGYARE, C.; ZIMBRES, F.M.; LÜERSEN, K.; HENSEL, A.; WRENGER, C.; LIEBAU, E. *In vitro* activity of extracts and isolated polyphenols from West African medicinal plants against *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Research**, v.111, p.827-834, 2002.

OMANSEN, T. F.; PORTER, J. L.; JOHNSON, P. D. R.; VAN DER WERF, T. S.; STIENSTRA, Y.; STINEAR, T. P. In-vitro activity of avermectins against *Mycobacterium ulcerans*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003549, 2015.

PANDA, S.; SWAMINATHAN, S.; HYDER, K. A.; CRISTOPHEL, E.; PENDSE, R. N.; SREENIVAS, A. N.; LAKSONO, S. J.; SRIVASTAVA, R.; NAIR, G. B.; ADITAMA, T.Y.; SINGHASIVANON, P.; THAPA, A. B.; SARKAR, S. K. Drug resistance in malaria, tuberculosis, and HIV in South East Asia: biology, programme, and policy considerations. **BMJ**, v. 358, p. 67-70, 2017.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2720-2722, 2002.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.

PRIETO, D. C. Planejamento e síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente ativos em doenças negligenciadas. Trabalho de Conclusão de Curso, 31p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo [apresentação em 19 de junho de 2017].

RANDO, D. G.; BRANDT, C. A.; FERREIRA, E.I. Use of *N*-methylene phosphonic chitosan to obtain an isoniazid prodrug. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 334-344, 2004.

RAUTIO, J.; KUMPULAINEN, H.; HEIMBACH, T.; OLIYAI, R.; OH, D.; JARVINEN, T.; SAVOLAINEN, J. Prodrugs: Design and clinical applications. **Nature Reviews Drug Discovery** 7, p. 255-270, 2008.

RENSLO, A. R.; MCKERROW, J. H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 12, p. 701–710, 2006.

SADEKAR, S.; THIAGARAJAN, G.; BARTLETT, K.; HUBBARD, D.; RAY, A.; MCGILL, L.D.; GHANDEHARI, H. Poly(amido amine) dendrimers as absorption enhancers for oral delivery of camptothecin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 456, p. 175-85, 2013.

SATIJA, J.; SAIB, V. V. R.; MUKHERJI, S. Dendrimers in biosensors: Concept and applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, p. 1467-1486, 2011.

SCALACCI, N.; BROWN, A. K.; PAVAN, F. R.; RIBEIRO, C. M.; MANETTI, F.; BHAKTA, S.; MAITRA, A.; SMITH, D. L.; PETRICCI, E.; CASTAGNOLO, D. Synthesis and SAR evaluation of novel thioridazine derivatives active against drug-resistant tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p.147-158, 2017.

SCHLESINGER, P. H.; KROGSTAD, D.J.; HERWALDT, B. L. Antimalarial agents: mechanisms of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, p. 793-798, 1988.

SELIN, M.; PELTONEN, L.; HIRVONEN, J.; BIMBO, L. M. Dendrimers and their supramolecular nanostructures for biomedical applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 34, p. 10-20, 2016.

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.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. L. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7 ed. LTC, 2006.

STOK, J. E.; GOLOSHCHAPOV, A.; SONG, C.; WHEELLOCK, C. E.; DERBEL, M. B. H.; MORISSEAU, C.; HAMMOCK, B. D. Investigation of the role of a second conserved serine in carboxylesterases via site-directed mutagenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, p. 247–255, 2004.

TRAGER, W.; JENSEN, J. D. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, p. 673–675, 1976.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, p. 455-461, 2010.

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.

TWIBANIRE, J. A. K.; GRINDLEY, T. B. Polyester dendrimers: smart carriers for drug delivery. **Polymers**, v. 6, p. 179-213, 2014.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, p. 609-623, 2003.

WHITE, N. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN T. T.; FAIZ, M. A.; MOKUOLU, O. A.; DONDORP, A. M. Malaria. **The Lancet Journal**, v. 383, n. 9918, p. 723–735, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report 2018**. Geneva, Switzerland, 2018. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653eng.pdf?ua=1> Acesso em: 16 jan 2019.

WHO (World Health Organization). HIV/AIDS, TB, Malaria and Neglected Tropical Diseases (HTM). Disponível em: <http://www.who.int/about/structure/organigram/htm/en/> Acesso em: 31 mai 2017.

YAN, Y.; ZHANG, D.; HUANG, S. Efficient conformational ensemble generation of protein-bound peptides. **Journal of cheminformatics**, v. 9, n. 1, p. 59, 2017.

YEOH, K. K.; CHAN, M. C.; THALHAMMER, A.; DEMETRIADES, M.; CHOWDHURY, R.; TIAN, Y.; STOLZE, I.; MCNEIL, L. A.; LEE, M. K.; WOON, E.

C. Y.; MACKEEN, M. M.; KAWAMURA, A.; RATCLIFFE, P. J.; MECINOVIC, J.; SCHOFIELD, C. J. Dual-Action Inhibitors of HIF Prolyl Hydroxylases That Induce Binding of a Second Iron Ion. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v.11, n. 5, p. 732–745, 2013.

YOUNG, J. Y.; WESTBROOK, J. D.; FENG, Z.; PEISACH, E.; PERSIKOVA, I.; SALA, R.; SEN, S.; BERRISFORD, J. M.; SWAMINATHAN, G. J.; OLDFIELD, T. J.; GUTMANAS, A.; IGARASHI, R.; ARMSTRONG, D. R.; BASKARAN, K.; CHEN, L.; CHEN, M.; CLARK, A. R.; CONSTANZO, L. D.; DIMITROPOULOS, D.; GAO, G.; GHOSH, S.; GORE, S.; GURANOVIC, V.; HENDRICKX, P. M. S.; HUDSON, B. P.; IKEGAWA, Y.; KENGAKU, Y.; LAWSON, C. L.; LIANG, Y.; MAK, L.; MUKHOPADHYAY, A.; NARAYANAN, B.; NISHIYAMA, K.; PATWARDHAN, A.; SAHNI, G.; SANZ-GARCIA, E.; SATO, J.; SEKHARAN, M. R.; SHAO, C.; SMART, O. S.; TAN, L.; VAN GINKEL, G.; YANG, H.; ZHURAVLEVA, M. A.; MARKLEY, J. L.; NAKAMURA, H.; KURISU, G.; KLEYWEGT, G. J.; VELANKAR, S.; BERMAN, H. M.; BURLEY, S. K. Worldwide Protein Data Bank biocuration supporting open access to high-quality 3D structural biology data. **Database**, v. 2018, p. 1-17, 2018.

ZAWILSKA, J. B.; WOJCIESZAK, J.; OLEJNICZAK, A. B. Prodrugs: a challenge for the drug development. **Pharmacological Reports**, v. 65, p.1-14, 2013.

ANEXOS

Anexo I

RMN de ^1H e ^{13}C dos materiais de partida

Espectro I: RMN de ^1H da primaquina.

^1H -RMN (DMSO), 300 MHz, δ = ppm

H14: 8.54 (d, J = 4.0 Hz, 1H), H13: 8.08 (d, J = 8.2 Hz, 1H), H17: 7.43 (dd, J = 8.2, 4.1 Hz, 1H), H6: 6.48 (d, J = 1.6 Hz, 1H), H12: 6.27 (s, 1H), H0 6.13 (d, J = 8.5 Hz, 1H), H18: 3.93 – 3.55 (m, 3H), H1 e H11: 3.48 – 1.70 (m, 3H), H3 e H16: 2.73 – 1.39 (m, 4H), H4: 1.22 (d, J = 6.2 Hz, 3H).

Espectro II: RMN de ^1H do pentaeritritol.

^1H -RMN (DMSO), 300 MHz, δ = ppm

H14:
4.01 (t, J = 5.3 Hz, 4H), H12; 3.28 – 3.13 (m, 12H).

Espectro III: RMN de ^{13}C do pentaeritritol.

^1H -RMN (DMSO), 75 MHz, δ = ppm

C12: 61.66, C13: 45.94.

4.41 (s,
8H),
H12:
3.87 (s,
8H),
H11:
3.33 –
2.92 (m,
16H),
H10:
0.82 (s,
12H).

Espectro V: RMN de ^{13}C do G1.

^1H -RMN (DMSO), 75 MHz, δ = ppm

C14: 174.12, C11: 63.77, C12: 61.86, C16: 50.40, C13: 42.50, C10: 16.72.

*Atividade de Intercâmbio na University of Groningen***EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E COCRISTALIZAÇÃO DE ANÁLOGOS COM POSSÍVEL INIBIÇÃO DE MtPtpA E MtPtpB PARA O TRATAMENTO DE TUBERCULOSE****1. Introdução**

A tuberculose é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria flexível e que tem como principal vantagem frente ao sistema imune do hospedeiro a capacidade de se adaptar a ambientes desfavoráveis criados pelas células de defesa humana. Esse patógeno é transmitido por gotículas de saliva humana, o que torna lugares com grande concentração de pessoas locais de alto risco de transmissão (KNECHEL, 2009).

Segundo dados dos relatórios anuais da Organização Mundial da Saúde (OMS) a prevalência de tuberculose em 2017 foi de 10,4 milhões de pessoas no mundo, com uma incidência média de 140/100 mil habitantes. Apesar de ter casos relatados na Europa e América do Norte, a maioria foi reportada no sudeste asiático (45%) e África (25%), o que aproxima, epidemiologicamente, das doenças negligenciadas. A **Figura 1** ilustra a incidência global de tuberculose no ano de 2017. No mesmo ano, a OMS registrou mortalidade de 1,3 milhões de pessoas em pacientes HIV-negativo. Desse número de mortes, 82% aconteceram nas mesmas regiões onde a incidência é maior: o sudeste asiático e a África (WHO, 2018).

Figura 1. Incidência global de tuberculose para cada 100 mil habitantes em 2017.

Ao entrar nos alvéolos do hospedeiro, a micobactéria é rapidamente capturada por macrófagos que, posteriormente, induzem a migração de células T para o local da infecção. Mesmo dentro dos macrófagos, essas bactérias conseguem se multiplicar, aumentando a quantidade de macrófagos e células T, criando, assim, um granuloma entorno do local infeccionado. Esse granuloma gera um ambiente na tentativa de limitar o crescimento bacteriano, causando a lise dos macrófagos e necrose tecidual. Mesmo com um baixo pH, hipóxia e com uma quantidade limitada de nutrientes, a micobactéria consegue mudar o seu fenótipo e sobreviver, ainda que em período de latência (KNECHEL, 2009).

Os tratamentos de primeira escolha consistem em combinações de quatro fármacos: rifampicina, pirazinamida, etambutol e isoniazida. O tratamento é demorado, entorno de 6 meses, resultando em baixa de adesão do paciente. Outro problema grave que tem colocado, novamente, a tuberculose como um dos problemas de saúde mais monitorados no mundo é a resistência aos antibióticos de primeira escolha. Já há relatos de multirresistência contra os quatro fármacos ao mesmo tempo, o que expõe a falta de opção de medicamentos disponíveis, bem como a falta de investimento no desenvolvimento de novos compostos (RABAH et al, 2017).

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo extremamente complexo e caro. A busca de um líder, ou seja, uma molécula com potencialidade para se tornar um fármaco, é demorada. Primeiramente, é necessário determinar o tipo de estratégia

de planejamento a ser utilizada, a baseada no alvo, chamada de *Structure Based Drug Design* (SBDD), ou no ligante *Ligand Based Drug Design* (LBDD) (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). Aproximadamente 70% de compostos líderes falham nas primeiras etapas de ensaios pré-clínicos, devido, principalmente, a toxicidade e problemas farmacocinéticos (FAKUNLE; LORING, 2012). O SBDD, por sua vez, é uma importante ferramenta baseada na estrutura química cristalografada de um alvo, enzima ou receptor para entender, principalmente, quais são e quais as características dos aminoácidos presentes nos bolsões de ligação. A partir dessas informações é possível fazer estudos computacionais como o *docking*, técnica que simula o encaixe de uma molécula no sítio de ligação do alvo, podendo inferir como seria essa interação, auxiliando, assim, no desenvolvimento de novos ligantes (KALYAANAMOORTHY, CHEN, 2011).

Dentre os novos alvos estudados para a tuberculose, destacam-se duas tirosinas fosfatases de micobactéria: a mtPtpA e a mtPtpB. A primeira impede a ligação entre o fagossomo e o lisossomo, bem como na modulação da indução de apoptose por células de defesa. Já a segunda está relacionada com a sobrevivência dentro dos macrófagos. Nos últimos anos, foram relatadas as primeiras moléculas com potencial inibição dessas enzimas, entre elas estão os derivados de ácido salicílico, as chalconas e os derivados de isoxazóis (CHATTERJEE et al, 2015).

Tendo em vista ao exposto, fica clara a necessidade de alternativas de tratamento para a tuberculose. Com isso, o desenvolvimento de inibidores de mtPtpA e mtPtpB são ótimas alternativas para se chegar a novas moléculas bioativas que tenham potencial de se tornarem medicamentos.

2. Objetivos

No laboratório do Professor Matthew Groves, da *University of Groningen*, pretende-se, primeiramente, expressar as enzimas mtPtpA e mtPtpB e, posteriormente, fazer a cocristalização dessas enzimas com as moléculas sintetizadas pelo Professor Alexander Domling, também da *University of Groningen*. Estes compostos apresentaram, em estudos prévios, resultados promissores em simulações de *docking* molecular. Pretende-se, ainda, analisar os cristais para o planejamento de análogos com estruturas químicas otimizadas.

3. Metodologia

3.1 Expressão das enzimas mtPtpA e mtPtpB (WAUGH et al, 2005)

A expressão de mtPtpA foi feita em células de *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3), próprias para a produção de proteínas, utilizando o vetor pETM carregando o gene RV2234 que consiste em um promotor T7-lac, 6-His tag e o sítio de clivagem do TEV (vírus do mosaico do tabaco). Foi adicionado ao meio de cultura IPTG (isopropil β -D1tiogalactopiranosídeo) que serve de indutor da expressão de genes, os quais não são característicos da bactéria utilizada. As bactérias foram mantidas em meio de cultura suplementadas por 0,5% de glicose, por 16 a 18 horas. A extração da proteína foi feita, primeiramente, centrifugando as bactérias a 5000 rpm a 4 °C por 30 minutos. O precipitado é ressuspenso usando o tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, pH 8,0) e na presença de lisozima e um inibidor de protease. Essa mistura foi suspensa utilizando sonicamento em ultrassom. O lisado de células foi, então, centrifugado a 18000 rpm por 45 minutos e em uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi separado para a purificação. Essa purificação foi feita usando uma coluna de purificação com um tampão A (50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, pH 8,0) e um tampão B (50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 500 mM de imidazol) e a corrida foi feita usando um gradiente de imidazol. Após essa primeira etapa, os eluentes com pico único no cromatograma foram injetados em uma coluna cromatográfica de troca aniônica usando um tampão A (50 mM de Tris-HCl, pH 8,5) e um tampão B (50 mM de Tris-HCl, 1 M de NaCl, pH 8,0). Após a coluna de troca aniônica os produtos eluídos foram injetados em uma coluna por exclusão de tamanho usando uma coluna HiLoad 16/60 Superdex 75 pré equilibrada com um tampão SEC (10 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl, pH 8,0). A expressão e purificação do MtPtpB foi feita do mesmo modo, porém, utilizando o plasmídeo contendo o gene RV0163.

3.2 Cocrystalização dos ligantes com as enzimas mtPtpA e mtPtpB e análise computacional (GRUDNER et al, 2007)

As enzimas mtPtpA e mtPtpB foram, primeiramente, adicionadas às soluções de 5 mM dos análogos selecionados. Após o tempo necessário para a ligação, as enzimas são separadas e diluídas a 16 mg/mL no caso da MtPtpB e 6,6 mg/mL para a MtPtpA. Em cada uma foram utilizados kits de cristalização como MIDAS, MORPHEUS, PACT, JCSG+ e HT-INDEX e a purificação foi feita utilizando 10 mM de Tris-base com pH 7,5 e NaCl.

As análises dos cocristais foi feita através do programa *Scorpion* onde foram estudadas as ligações de cada um dos análogos com as enzimas para elucidar o mecanismo de inibição de cada um e planejar melhorias estruturais das moléculas para o planejamento de novos ligantes.

4. Resultados e discussão

A biblioteca FS contendo inibidores covalentes à base de acrilamida foi a primeira testada contra PtPA. Os resultados mostraram alguns acertos como FS185, FS137 e FSGOI, este último já mostrou atividade contra o PtPB. A **Figura 2** mostra as curvas de cada composto e a **Figura 3** mostra a porcentagem de ativação do PNPP dos melhores compostos. Alguns compostos como FS217 e FS155 parecem ativar a enzima, provavelmente isso está acontecendo porque eles alteram o pH, aumentando a atividade de PtPA e não por ativação direta.

Figura 2: Curva de atividade para cada inibidor testado.

Figura 3: Porcentagem de ativação de PNPP pelos principais inibidores encontrados

Também foram rastreados os compostos à base de ácido borônico que foram planejados para serem inibidores competitivos, uma vez que há uma indicação de que essa fração possa imitar o fosfato e, portanto, se ligar à enzima. A triagem mostrou três ocorrências: TAT106, DMNT10 e MIS55. As **Figura 4** e **Figura 5** mostram as curvas para cada composto e a porcentagem de ativação desses compostos.

Figura 4: Curva de atividade para cada inibidor competitivo testado.

Figura 5: Porcentagem de ativação de PNPP para os melhores análogos encontrados. Após encontrar os hits em cada biblioteca, eles foram testados novamente em triplicado para confirmar sua atividade. Após o teste, o composto 4 foi escolhido para medir o IC50: TAT106, FS213, DNMT10 e FS137. As **Figura 6** e **Figura 7** ilustram as curvas para cada composto testado em triplicado e a porcentagem de ativação de PNPP para as melhores moléculas.

Figura 7: Porcentagem de ativação dos melhores análogos testados em triplicata. A medição de IC₅₀ em PtPA e PtPB não mostrou bons resultados, como pode ser visto na **Figura 8**. A dose inicial de 1 mM parece inibir a proteína, mas em 0,5 mM já é possível notar alguma atividade e, portanto, o valor calculado de IC₅₀ é alto (0,415 mM). Estes dados e a baixa solubilidade na água de todos esses análogos podem indicar que a proteína está sendo morta por outros

Figura 8: Curva de IC50 do análogo TAT106.

Os outros compostos mostraram o mesmo padrão de curva, por isso era necessário verificar se as porções básicas que foram projetadas para se ligarem às proteínas podem de fato se ligar aos alvos. Assim, foi testada a afinidade de ligação da acrilamida, o componente básico dos inibidores covalentes (FS BB), ácido bórico e citrato (esses dois últimos funcionariam como inibidores competitivos). Todos os compostos são mostrados na **Figura 9**.

Acrylamide

FS BB

Citrate

Boric acid

Figura 9: Estruturas base testadas contra PtPA e PtPB.

Os resultados em PtPB não mostraram atividade de nenhuma das moléculas como pode ser observado na **Figura 10**. No entanto, para o PtPA, tanto a acrilamida quanto o FS BB apresentaram uma boa atividade, principalmente o FS BB (curva cinza). A **Figura 11** mostra as curvas de atividade para cada composto contra PtPA.

Figura 10: Atividade dos compostos precursores contra PtPB

Figura 11: Atividade dos compostos precursores contra PtPA.

Este resultado indica que a acrilamida pode se ligar à cisteína do local ativo de PtPA. Para confirmar o teste de ligação, foi feita uma medida de IC₅₀. A **Figura 12** mostra que a curva, diferente dos hits das bibliotecas, tem um perfil de inibição direta. Ademais, o valor IC₅₀ (0,163 mM) é um bom ponto de partida para um *building block*.

Figura 12: Curva de IC50 do FSBB.

Após estabelecer que a acrilamida poderia se ligar à proteína, uma nova série de análogos foi planejada com base na estrutura da tirosina. Utilizando o anel aromático ligado diretamente à acrilamida, esperava-se aumentar a afinidade com as fosfatases. Os dois primeiros análogos FS440 e FS441 foram sintetizados seguindo essa estratégia. A **Figura 13** ilustra a lógica por trás da nova série de análogos.

Figura 13: Planejamento dos análogos FS440 e FS441 baseado na estrutura da tirosina.

Os novos análogos foram então testados para verificar sua afinidade com o PtPA. Os resultados mostraram que ambos, como esperado, inibiram a enzima em uma concentração de 250 μ M, como pode ser visto na **Figura 14**.

Figura 14: Curva de atividade dos compostos FS440 e FS441 contra PtPA.

Após confirmar que o FS440 e o FS441 podem se ligar ao PtPA, foram calculados os seus respectivos IC₅₀. Para o FS440, a curva (**Figura 15**) a curva saiu dentro do esperado e o valor diminuiu substancialmente (0,065 mM). Isso pode indicar que os novos análogos podem se ligar melhor à enzima do que o *building block*, o que indica um ganho de especificidade. Novos análogos serão desenvolvidos para diminuir ainda mais o valor do IC₅₀.

Figura 15: Curva de IC50 para o análogo FS440.

Os ensaios de cristalização não ocorreram como esperado. Os primeiros ensaios usando os kits de cristalização formaram alguns cristais no C12 do kit JCSG. No entanto, após a refração de Raio-X, descobriu-se que eram cristais de zinco e não proteínas. Mesmo as triagens usando o método dos artigos não resultaram na formação de cristais. No entanto, os exames mostraram que as proteínas não sobreviveram em altas concentrações de PEG (acima de 12% de PEG 6000) e baixo pH (abaixo de 6,5). Os próximos passos estão tentando cristalizar a proteína e absorver os análogos projetados recentemente (FS440 e FS441) para ajudar a orientar o planejamento das próximas moléculas.

5. Conclusão e perspectivas

As bibliotecas de compostos testadas inicialmente indicaram alguns *hits* que poderiam inibir as enzimas PtPA e PtPB, porém não foi possível indicar que qualquer delas tinham a capacidade de inibir diretamente as fosfatases. Com isso, foi necessário testar se a hipótese de que os compostos derivado de acrilamida podiam reagir covalentemente com a cisteína presente no bolsão catalítico das fosfatases. Assim, testou-se a acrilamida e o *building block* utilizado na síntese da biblioteca original, além de borato e citrato como possíveis inibidores competitivos. Os resultados mostraram que tanto a acrilamida quanto o *building block* eram

capazes de inibir PtPA, porém não PtPB. A partir disso, foram desenhados dois outros compostos utilizando a acrilamida e a estrutura geral da tirosina (FS440 e FS441). Ambos compostos mostraram uma capacidade de inibição de PtPA, e o composto FS440 teve um IC50 abaixo de 0,1 mM, o que é um importante ponto de partida para o planejamento de compostos ainda mais específicos e com uma atividade melhor. Como perspectiva, além do planejamento de melhores análogos está a cristalização do PtPA e posteriormente cocrystalização dos compostos para auxiliar no desenvolvimento de novas moléculas.

6. Referências

CAHTTERJEE, A.; PANDEY, S.; SINGH, P.K.; PATHAK, N.P.; RAI, N.; RAMACHANDRAN, R.; TRIPATHI, R.P.; SRIVASTAVA, K.K. Biochemical and functional characterizations of tyrosine phosphatases from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria: indication of phenyl cyclopropyl methyl-/phenyl butenyl azoles as tyrosine phosphatase inhibitors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, p.7539-7548, 2015.

FAKUNLE, E. S.; LORING, J. F. Ethnically diverse pluripotent stem cells for drug development. **Trends in Molecular Medicine**, v18, p.709–716, 2012.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Drug design, biotechnology and medicinal chemistry: applications to infectious diseases. **Estudos Avançados**, v.24, p.81– 98, 2010.

GRUDNER, C.; PERRIN, D.; HUIJSDUIJNEN, H.; SWINNEN, D.; GONZALEZ, J.; GEE, C.L.; WELLS, T.N.; ALBER, T. Structural basis for selective inhibition of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase PtpB. **Structure**, v.15, p.499-509, 2007.

KNECHEL, N.A. Tuberculosis: Pathophysiology, Clinical Features, and Diagnosis. **Critical Care Nurse**, v.29, p.34-43, 2009

RABAHI, M.F.; JUNIOR, J.L.; FERREIRA, A.C.; TANNUS-SILVA, D.G.; CONDE, M.B. Tratamento da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.43, p.472-486, 2017.

KALYAANAMOORTHY, S.; CHEN Y,P. Structure-based drug design to augment hit discovery. **Drug Discovery Today**, v.16, p.831-839, 2011.

WAUGH, D.S. Making the most of affinity tags. *Trends biotechnology*, v. 23, p.316-320, 2005.
WHO (World Health Organization). Global tuberculosis report. Switzerland, 2018.

Anexo III

Ficha do

Aluno e Currículo Lattes

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 7705197/1 - Diego Campos Prieto

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5777-3/9	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	03/08/2017	15/11/2017	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5724-8/1	Latenciação	11/09/2017	19/11/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5734-8/1	Mecanismos de Ação dos Fármacos aos Níveis Molecular e Eletrônico	20/02/2018	05/06/2018	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/6	Aprimoramento Pedagógico	03/04/2018	30/04/2018	60	4	90	A	N	Concluída
BMF5871-3/1	Neurobiologia do Envelhecimento & Hormese e as Doenças Neurodegenerativas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	06/08/2019	09/09/2019	120	8	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	27
Estágios:			
Total:	0	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Diego Campos Prieto

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1465359683870012>

Última atualização do currículo em 18/08/2019

Resumo informado pelo autor

Cursou Farmácia e Bioquímica na Universidade de São Paulo, período noturno. Tem experiência na área de química farmacêutica, sendo que de fevereiro de 2013 a Julho de 2014 frequentou o Laboratório de Síntese de Fármacos, com orientação do professor Dr. Roberto Parise Filho. Nesse período, aprimorou sua prática em síntese orgânica aplicada a fármacos, mais especificamente aminação redutiva e alquilação de amins, realizando experimentos como recristalização, cromatografia em coluna e em camada delgada, leitura de espectros de $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ RMN. Além disso realizou projetos na área de atenção farmacêutica, mais precisamente em seguimento farmacoterapêutico. De janeiro a junho de 2019 fez um estágio no laboratório de biologia estrutural da Faculty of Science and Engineering da University of Groningen sob orientação do Prof. Dr. Matthew Groves. Atualmente realiza um projeto na área de Química Farmacêutica com síntese de pró-fármacos dendrímeros para doenças negligenciadas no LAPEN sob orientação da professora doutora Jeanine Giarolla Vargas.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Diego Campos Prieto

Dados pessoais

Nascimento 07/03/1993 - São paulo/SP - Brasil

CPF 418.601.518-09

Formação acadêmica/titulação

2017 Mestrado em Fármacos e Medicamentos.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS POTENCIALMENTE ATIVOS EM MALÁRIA E TUBERCULOSE: SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA
Orientador: Elizabeth Igne Ferreira

2011 - 2017 Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS DENDRIMÉRICOS POTENCIALMENTE ATIVOS EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS
Orientador: Jeanine Giarolla Vargas

2008 - 2010 Ensino Médio (2o grau).
Colégio Stockler, STO, Brasil, Ano de obtenção: 2010

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2014 - 2015 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 6, Regime: Parcial

2013 - 2014 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

08/2014 - 07/2015 Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Linhas de pesquisa:
Estudo descritivo-exploratório e retrospectivo com abordagem qualitativa sobre a Prática de Atenção Farmacêutica no Brasil, no período de 2002-2014, com foco nos desfechos terapêuticos

01/2013 - 07/2014 Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Linhas de pesquisa:
SÍNTESE DE ANÁLOGOS DA QUELERITRINA PLANEJADOS POR SIMPLIFICAÇÃO MOLECULAR COM POTENCIAL INIBIÇÃO DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2

2. University of Groningen - RUG

Vínculo institucional

2019 - Atual

Linhas de pesquisa

1. Estudo descritivo-exploratório e retrospectivo com abordagem qualitativa sobre a Prática de Atenção Farmacêutica no Brasil, no período de 2002-2014, com foco nos desfechos terapêuticos
2. SÍNTESE DE ANÁLOGOS DA QUELERITRINA PLANEJADOS POR SIMPLIFICAÇÃO MOLECULAR COM POTENCIAL INIBIÇÃO DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2

Objetivos: Câncer é uma das principais causas de mortes no mundo e foi responsável por aproximadamente 8,2 milhões de óbitos em 2012. A quimioterapia torna-se necessária para o tratamento, pois diminui as chances de metástases e regride o crescimento tumoral. Linhagens tumorais que apresentam alta expressão de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2 mostram-se resistentes à ação de quimioterápicos antineoplásicos disponíveis na terapêutica. Portanto, o desenvolvimento de compostos que inibem essas proteínas, torna-se interessante para o tratamento do câncer. A queleritrina, um alcaloide presente no *Chelidonium majus*, representa um atraente protótipo para o desenvolvimento de inibidores de Bcl-2, visto que esta molécula apresenta atividade antiproliferativa por meio da inibição da Bcl-XL, proteína supressora da apoptose. Face ao exposto, o objetivo deste trabalho é sintetizar análogos da queleritrina planejados por simplificação molecular e testar, posteriormente, sua atividade citotóxica. A síntese dos compostos foi realizada em duas etapas, com metodologias baseadas em reações de adição nucleofílica com posterior redução e reações de alquilação. Os análogos foram caracterizados por metodologias analíticas como a espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C. Posteriormente, os análogos serão avaliados quanto a sua citotoxicidade em linhagem de fibroblasto humano fetal de pulmão (MRC-5), e quanto à atividade antiproliferativa, em linfoma do manto (Granta 519) e linfoblastoide humana (Jurkat), pois essas representam linhagens que são conhecidas pela alta expressão de proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2. Paralelamente a esses ensaios, serão desenvolvidos métodos *in silico* para determinar propriedades dos compostos sintetizados e elucidar possível relação estrutura-atividade (REA) entre os análogos. Espera-se desenvolver compostos com atividade superior à queleritrina, como potenciais candidatos a fármacos que possam ampliar o arsenal terapêutico para o tratamento de neoplasias.

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. VIEIRA GONZAGA, RODRIGO; DA SILVA SANTOS, SORAYA; DA SILVA, JOAO; CAMPOS PRIETO, DIEGO; FELICIANO SAVINO, DÉBORA; GIAROLLA, JEANINE; IGNE FERREIRA, ELIZABETH Targeting Groups Employed in Selective Dendrons and Dendrimers. PHARMACEUTICS. v.10, p.219 - , 2018.
2. SANTOS, SORAYA SILVA; GONZAGA, RODRIGO VIEIRA; SILVA, JOÃO VITOR; SAVINO, DÉBORA FELICIANO; PRIETO, DIEGO CAMPOS; SHIKAY, JENNIFER MIDORI; SILVA, RENAN SOUSA; PAULO, LUCAS HENRIQUE DE ALMEIDA; FERREIRA, ELIZABETH IGNE; VARGAS, JEANINE GIAROLLA Peptide dendrimers: drug/gene delivery and other approaches. CANADIAN JOURNAL OF CHEMISTRY. v.00, p.1 - 10, 2017.
3. TAVARES, MAURÍCIO T.; TEIXEIRA, SARAH F.; AZEVEDO, RICARDO A.; C, PIETRO, DIEGO; C, PIETRO, DIEGO; FERREIRA, ADILSON K.; TROSSINI, GUSTAVO H.G.; BARBUTO, JOSÉ A.M.; PARISE-FILHO, ROBERTO Toward chelerythrine optimization: Analogues designed by molecular simplification exhibit selective growth inhibition in non-small-cell lung cancer cells. BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY. v.24, p.4600 - 4610, 2016.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 23/01/2020 às 18:34:27.