

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Estudo da síntese de pró-fármacos dendriméricos  
potencialmente cardiovasculares contendo rosuvastatina e  
ácido acetilsalicílico

Andressa Polidoro

Dissertação para obtenção do grau de

**MESTRE**

Orientadora: Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo

2013

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

Polidoro, Andressa  
P766e Estudo da síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente  
cardiovasculares contendo rosuvastatina e ácido acetilsalicílico /  
Andressa Polidoro. -- São Paulo, 2013.  
211p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador : Ferreira, Elizabeth Igne

1. Latenciação : Química farmacêutica 2. Doenças cardiovasculares  
3. Fármaco : Síntese : Química farmacêutica I. T. II. Ferreira,  
Elizabeth Igne, orientador.

615.19 CDD

Andressa Polidoro

Estudo da síntese de pró-fármacos dendriméricos  
potencialmente cardiovasculares contendo rosuvastatina e  
ácido acetilsalicílico

Comissão Julgadora da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira  
orientadora/presidente

---

1°. examinador

---

2°. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## *Dedico este trabalho:*

*A Deus, pela proteção e por me guiar até esse momento tão importante da minha vida. Obrigada por ter colocado pessoas iluminadas e inspiradoras no meu caminho.*

*À Nossa Senhora Aparecida, minha mãezinha, agradeço por estar ao meu lado em mais essa conquista e peço a sua benção, para todos aqueles que de alguma maneira me ajudaram a chegar até aqui.*

*Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.*

*Louis Pasteur*

*À minha família:*

*Aos meus queridos e amados pais, Edson Aparecido Farinassi Polidoro e Tereza Rita de Assis Polidoro. Faltam palavras para expressar o amor e a gratidão que sinto por vocês. Obrigada por me ensinarem desde menina o caminho da honestidade e da humildade. Obrigada pelo apoio incondicional nas minhas escolhas e por todo suor derramado para que eu conquistasse mais essa etapa da minha e das nossas vidas. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês!*

*Ao meu irmão mais velho preferido, Paulo Ricardo Polidoro. Você é e sempre será meu espelho. Desejo um dia ser ao menos um pedaço do que você é como filho, amigo e profissional. Obrigada pelo apoio e por me proteger durante todos esses anos.*

*E nada funciona melhor do que ter alguém que você ama  
te abraçando.*

*Jhon Lennon*

*Ao meu amigo, companheiro e namorado, Felipe Massao Futagawa. Obrigada pela amizade, respeito, amor e, principalmente, pela paciência e compreensão nos momentos de ausência. Saiba que o seu apoio tornou a conclusão desse trabalho mais simples e doce.*

*Que não seja imortal, posto que é chama  
Mas que seja infinito enquanto dure.*

*Vinícius de Moraes*

*À minha orientadora e “profi” querida, professora Titular Elizabeth Igne Ferreira, a quem guardarei para sempre um imenso carinho e gratidão. Obrigada por ter confiado no meu trabalho e me acolhido no seu grupo. Obrigada pelo projeto desafiador que trouxe não só inúmeros ensinamentos científicos, mas também, ensinamentos de vida. Obrigada por ter me ensinado a acreditar nos meus sonhos e por me fazer uma pessoa e uma profissional melhor a cada dia. Ser sua aluna e sua amiga é um privilégio! Jamais esquecerei os bons momentos que vivemos nesses últimos anos... Obrigada, obrigada e obrigada!*

*Se você pode sonhar, você pode fazer.*

*Walt Disney*

*À Dra. Jeanine Giarolla Vargas, colaborada desse projeto e minha irmã de coração. Agradeço por me acompanhar desde a iniciação científica e por dividir comigo não só todo o seu conhecimento em dendrímeros, mas também, momentos de muita alegria e conquistas. Sem o seu auxílio e, principalmente, sem a sua amizade que é tão valiosa para mim, esse trabalho não seria o mesmo. Muito obrigada colega!*

*A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você.*

*Ralph Waldo Emerson*



*A professora Ms. Michelle Carneiro Polli Parise, por me apresentar a Química Farmacêutica com tanto entusiasmo e me incentivar a seguir esse caminho. Obrigada pelo seu apoio e amizade! Espero um dia saber lecionar e entusiasmar meus alunos com tanta dedicação e paixão como você o faz.*

*Feliz aquele que transfere o que sabe, e aprende o que ensina.*

*Cora Coralina*

# *Agradecimentos*

*Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo por permitir a realização desse projeto.*

*À FAPESP pelo auxílio financeiro.*

*À Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto pela amizade e colaboração com os estudos de modelagem molecular.*

*À professora Dra. Daniela Gonçalves Rando, pelas sugestões valiosas no exame de qualificação e pelos momentos agradáveis que compartilhamos nesses últimos anos.*

*À professora Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, pela supervisão no estágio em docência e pelas sugestões no exame de qualificação. Obrigada por contribuir com a minha formação.*

*Aos pós-doutorandos Marco Aurélio da Graça Arribas, Fabrício Vargas e Márcio Henrique Zaim, por todo auxílio e sugestões na síntese.*

*À minha eterna “roommate” e amiga querida Vanessa Almeida Otelo. Obrigada por ter sido a minha família no período em que dividimos o mesmo teto. Conviver com uma pessoa de coração e bondade tão raros foi inesquecível.*

*À minha companheira e amiga para todas as horas: Soraya da Silva Santos. Obrigada pelos incontáveis bons momentos que passamos juntas, pelo apoio, conselhos, discussões científicas e cotidianas que foram fundamentais para a conclusão desse projeto. Estarei sempre torcendo por você!*

*Ao professor Dr. Roberto Parise Filho, pela amizade e boa convivência.*

*Aos colegas e vizinhos de laboratório: Ana Luisa Cadore, Bárbara Vaz, Camila Tanabe, Charles de Lima Brito, Drielli Gomes Vital, Fernando de Moura Gatti, Elys Cardoso, Fredson Torres Silva, Giulia Kassab, Hamilton Bigatão, João Paulo Lemes (in memmorian), Juliana Pacchioni, Kely Turra, Lara Ferrari, Leila Uehara, Leonardo Xavier, Lorena Paes, Marina Primi, Natanael Segretti, Matheus Malta de Sá, Patrícia Sotelo, Ricardo D'Agostini Garcia, Ricardo Serafim, Rodrigo Gonçalves, Silvestre Modestia e Tacila Muniz. Obrigada pelos momentos de descontração, experiências compartilhadas e companhia nesses últimos anos!*

*À Maria Inês de Almeida Gonçalves, pelo suporte técnico com as análises de Ressonância Magnética Nuclear.*

*Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas:  
David, Bete, Kelma, Daniela, Jorge e Elaine, que sempre  
solícitos, me auxiliaram com as questões burocráticas da pós-  
graduação. Obrigada por toda a ajuda!*

*À minha tia Celeste Gallo Polidoro e aos meus primos  
caninos Julie, Toff e Messi, pelas inúmeras caronas para São  
Paulo. Talvez você não imagine a importância dessas caronas,  
mas saiba que esse incentivo foi essencial para conclusão desse  
trabalho.*

*a todos vocês o meu **MUITO OBRIGADA!***

*“Bote fé” e a vida terá um sabor novo, terá uma bússola  
que indica a direção; “bote esperança” e todos os seus dias  
serão iluminados e o seu horizonte já não será escuro, mas  
luminoso; “bote amor” e a sua existência será como uma casa  
construída sobre a rocha e o seu caminho será alegre, porque  
encontrará muitos amigos que caminham com você.*

*Papa Francisco*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
1.1	DOENÇAS CARDIOVASCULARES E ATEROSCLEROSE .....	1
1.2	EPIDEMIOLOGIA .....	3
1.3	FATORES DE RISCO ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES .....	5
1.3.2	Fatores de risco reversíveis.....	8
1.3.2.1	Dislipidemias .....	8
1.3.2.2	Outros fatores de risco reversíveis .....	11
1.4	FISIOPATOLOGIA DA ATEROSCLEROSE .....	13
1.5	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO .....	15
1.5.1	Fármacos hipolipemiantes.....	15
1.5.1.1	Ácido nicotínico .....	16
1.5.1.2	Fibratos.....	17
1.5.1.3	Sequestrantes de ácidos biliares.....	18
1.5.1.4	Inibidor da absorção de colesterol.....	20
1.5.1.5	Inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase .....	21
1.5.2	Agentes antitrombóticos .....	26
1.5.2.1	Cascata de coagulação e fármacos anticoagulantes.....	26
1.5.2.2	Agentes fibrinolíticos.....	31
1.5.2.3	Mecanismo da agregação plaquetária e fármacos que atuam na sua inibição .....	31
1.5.2.4	Associação entre estatinas e ácido acetilsalicílico para prevenção de doenças cardiovasculares .....	40
1.6	PLANEJAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS.....	41
1.7	LATENCIAÇÃO .....	41
1.8	DENDRÍMEROS.....	43
1.8.1	Síntese dos dendrímeros.....	47
1.8.2	Aplicações dos dendrímeros .....	48
1.9	MODELAGEM MOLECULAR .....	51
2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....	55
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	57
3.1	MATERIAL.....	57

3.1.1	Reagentes e solventes .....	57
3.1.2	Equipamentos.....	58
3.1.3	Softwares para modelagem molecular .....	58
3.2	MÉTODOS .....	59
3.2.1	Síntese .....	59
3.2.1.1	Síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético (ácido málico protegido) .....	61
3.2.1.2	Síntese do pró-fármaco dendrimérico de primeira geração .....	62
3.2.1.2.1	<i>Síntese do intermediário IA – mio-inositol como foco central</i> ....	62
3.2.1.2.2	<i>Síntese do intermediário IB – etilenoglicol como foco central</i> ....	70
3.2.1.2.3	<i>Síntese do malato de etilenoglicol</i> .....	74
3.2.1.2.4	<i>Síntese do intermediário II</i> .....	76
3.2.1.2.5	<i>Síntese da rosuvastatina protegida</i> .....	81
3.2.2	Métodos de análise dos compostos obtidos .....	82
3.2.2.2	Análise Cromatográfica .....	82
3.2.3	Modelagem molecular .....	83
3.2.3.1	Estudo <i>in silico</i> de liberação dos pró-fármacos dendriméricos de primeira geração .....	83
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	85
4.1	SÍNTESE .....	85
4.1.1	Síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético (ácido málico protegido) .....	85
4.1.2	Síntese dos pró-fármacos dendriméricos .....	88
4.1.2.1	Síntese do intermediário IA – mio-inositol como foco central ....	88
4.1.2.2	Síntese do intermediário IB – etilenoglicol como foco central..	119
4.1.2.3	Síntese do malato de etilenoglicol .....	143
4.1.2.4	Síntese do intermediário II.....	150
4.1.2.5	Síntese da rosuvastatina protegida .....	171
4.2	MODELAGEM MOLECULAR .....	174
4.2.1	Estudo <i>in silico</i> de liberação do pró-fármaco dendrimérico de primeira geração .....	174
5	CONCLUSÕES PARCIAIS .....	181
6	PERSPECTIVAS .....	184
7	REFERÊNCIAS .....	185

POLIDORO, A. **Estudo da síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente cardiovasculares contendo rosuvastatina e ácido acetilsalicílico.** 2013. 212p. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.

## RESUMO

Doenças cardiovasculares podem ocasionar manifestações clínicas graves como infarto agudo do miocárdio e acidentes vasculares trombóticos, constituindo a principal causa de morte no mundo, fato esse que desperta grande interesse da indústria farmacêutica. As causas normalmente estão relacionadas à elevação dos níveis de colesterol e à agregação plaquetária, que acarretam eventos vaso-oclusivos. Entre as alternativas terapêuticas para o controle e prevenção das doenças cardiovasculares podem-se destacar os inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase), popularmente conhecidos como estatinas. A rosuvastatina merece destaque nessa classe de fármacos, devido à maior seletividade e potência na redução dos níveis de colesterol LDL. O ácido acetilsalicílico, antiinflamatório não-esteróide, também representa uma importante alternativa terapêutica para prevenção de doenças cardiovasculares, devido à sua ampla aceitação como inibidor da agregação plaquetária. Considerando seus mecanismos de ação, estatinas e ácido acetilsalicílico podem ser usados em conjunto para a prevenção de doenças cardiovasculares. Face ao exposto e tendo-se em vista a importância dos dendrímeros como transportadores de fármacos na latenciação, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver o pró-fármaco dendrimérico potencialmente ativo em doenças cardiovasculares contendo rosuvastatina e ácido acetilsalicílico. Diversas metodologias de síntese foram realizadas na tentativa de obtenção do pró-fármaco dendrimérico composto por *mio*-inositol ou etilenoglicol como foco central, ácido L(-)-málico e etilenoglicol como espaçantes e rosuvastatina e ácido acetilsalicílico como compostos bioativos. Parte dos intermediários propostos foi sintetizada e purificada com sucesso. As maiores dificuldades encontradas foram a purificação dos compostos e a hidrólise seletiva da proteção do ácido málico protegido. Adicionalmente, realizaram-se estudos computacionais para prever a liberação dos fármacos do pró-fármaco dendrimérico.

**Palavras-chave:** doenças cardiovasculares; aterosclerose; dendrímeros; latenciação.

POLIDORO, A. **Synthesis study of potential cardiovascular dendrimer prodrugs containing aspirin and rosuvastatin.** 2013. 212p. Dissertation – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2013.

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases can lead to several clinical manifestations such as myocardial infarction and stroke. Those diseases represent the main cause of death globally and this fact triggers a great interest from the pharmaceutical industries. The causes are usually related to high cholesterol levels and platelet aggregation, which are responsible for the vaso-occlusive events. Among the available drug therapy for control and prevention of cardiovascular diseases, the inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase), popularly known as statins, can be highlighted. Rosuvastatin deserves mention in this class of drugs due to its greater selectivity and potency in reducing the levels of LDL cholesterol. Aspirin, a nonsteroidal anti-inflammatory, also represents an important drug therapy for treatment and prevention of cardiovascular diseases, due to its widespread acceptance as a platelet aggregation inhibitor. Considering their mechanism of action, aspirin and statin can be used in association for prevention of cardiovascular diseases. This said and taken into account that dendrimers are important as carriers in prodrug design the purpose of this work was the synthesis of dendrimer prodrugs potentially active in cardiovascular diseases containing aspirin and rosuvastatin. Several synthetic methods have been used with the aim to synthesizing the dendrimer prodrugs composed of *myo*-inositol or ethyleneglycol as core, L-(-)-malic acid and ethyleneglycol as spacer groups and rosuvastatin and aspirin as bioactive compounds. Some of the proposed intermediates was synthesized and purified successfully. The main difficulties were purification of compounds and selectivity desprotection of protected malic acid. Additionally, computational studies were performed in order to predict the release of those drugs from dendrimer prodrugs.

**Keywords:** cardiovascular diseases; atherosclerosis; dendrimers; prodrug design.



# *Introdução e Objetivos*

*Uma idéia que não é perigosa não merece nem mesmo ser  
chamada de idéia.*

*Oscar Wilde*

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES E ATEROSCLEROSE

As doenças cardiovasculares (DCVs) são consideradas a principal causa mundial de mortes no século XXI (PSARROS et al., 2012). Essas doenças fazem parte de um grupo de enfermidades crônicas não transmissíveis e são, em sua maioria, provenientes de um processo aterosclerótico, que pode levar ao desenvolvimento de doença arterial coronariana, doença cerebrovascular e doença vascular periférica (SANTOS et al., 2008; WHO, 2011a). Outras DCVs, que não serão discutidas neste trabalho e que independem do desenvolvimento da aterosclerose, são as doenças congênitas e reumáticas do coração, cardiomiopatias e arritmias cardíacas (WHO, 2011a).

A aterosclerose é caracterizada por processo inflamatório progressivo e crônico, que acomete artérias de médio e grande calibre (LAHOZ, MOSTAZA, 2007; TOTH, 2008; Van DIJK et al., 2010). Há mais de 150 anos a aterosclerose é considerada uma doença, no entanto, o entendimento sobre a sua etiologia e evolução tem crescido intensamente nos últimos anos (BAHIA et al., 2006; LIBBY, RIDKER, HANSSON, 2009).

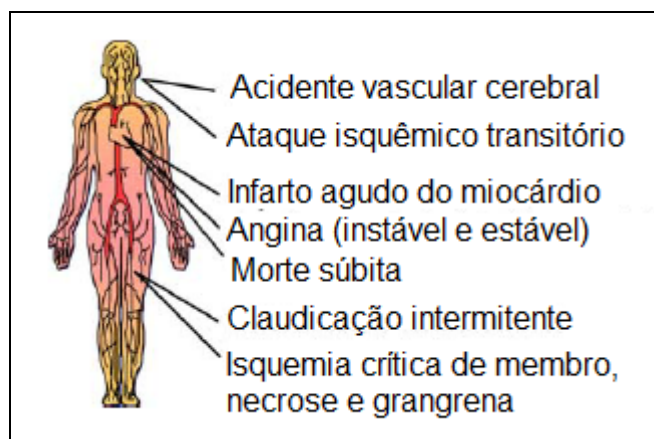
O seu desenvolvimento é marcado por espessamento da camada íntima e média das artérias com consequente perda de sua elasticidade. Esse espessamento é ocasionado pela formação de uma placa a partir do acúmulo de lipídeos, tecido fibroso e células inflamatórias que, após diversos estágios de progressão, leva o nome de placa de ateroma (LAHOZ, MOSTAZA, 2007).

A placa de ateroma é a responsável pelas manifestações clínicas da doença. Isso porque ela é capaz de estreitar a luz do vaso sanguíneo e, conseqüentemente, reduzir a disponibilidade de oxigênio para os tecidos, processo denominado de isquemia tecidual. Além disso, placas ricas em lipídeos são instáveis e podem se romper levando à formação do trombo, principal mediador de eventos vaso-oclusivos, aumentando o risco de infarto agudo do miocárdio e morte (INSULL Jr, 2009).

De acordo com França e Coates (2002), esse processo pode ter início na infância e progredir lentamente até a vida adulta, quando incidirão as manifestações clínicas da doença. Estudos demonstram que as estrias gordurosas, precursoras da placa de ateroma, podem aparecer na camada íntima da aorta aos três anos de idade e nas coronárias durante a adolescência (FORD, 2003).

Como as placas de ateroma apresentam tendência em se desenvolver nas artérias que fornecem sangue ao coração (artérias coronárias), ao cérebro (artéria carótida, artéria vertebral e artérias cerebrais) e artérias de extremidade inferior (artéria íliaca e femoral), as manifestações clínicas são mais evidentes nesses locais (LAHOZ, MOSTAZA, 2007).

Os sinais e sintomas variam de acordo com o local afetado e estão diretamente relacionados com a perfusão sanguínea limitada, que reduz a disponibilidade de oxigênio para os tecidos (isquemia tecidual), em decorrência da obstrução dos vasos que os alimentam (BRASHERS, 2008). A Figura 1 traz representação dos locais mais afetados pela aterosclerose e suas manifestações clínicas.



**Figura 1.** Manifestações clínicas da aterosclerose (adaptado de VILES-GONZALEZ, FUSTER, BADIMON, 2004).

No geral, quando as artérias coronárias são comprometidas, o paciente pode desenvolver síndrome coronariana aguda (angina e infarto agudo do miocárdio) ou, até mesmo, morte súbita (GRECH, RAMSDALE, 2003; LAHOZ, MOSTAZA 2007). No cérebro, a principal consequência é o acidente vascular cerebral (AVC) e o ataque isquêmico transitório, que, quando ocorre em episódios sucessivos, pode levar o paciente à demência. Já nas artérias

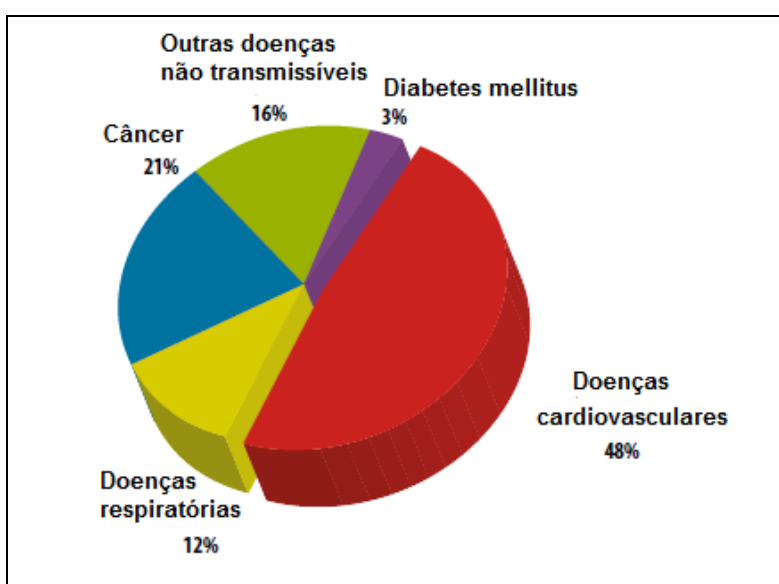
periféricas, utiliza-se o termo claudicação intermitente ou isquemia aguda menor para suas manifestações clínicas, que são caracterizadas pela dor intensa e muitas vezes limitante dos membros inferiores. Pode ocorrer também a isquemia crítica de membro com evolução para necrose e gangrena (VILES-GONZALEZ, FUSTER, BADIMON, 2004; LAHOZ, MOSTAZA, 2007).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

Apesar do significativo avanço no diagnóstico e tratamento, as DCVs constituem a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo, afetando tanto países de baixa e média renda, quanto países de alta renda (CHAPMAN, 2007; FRANCO et al., 2011).

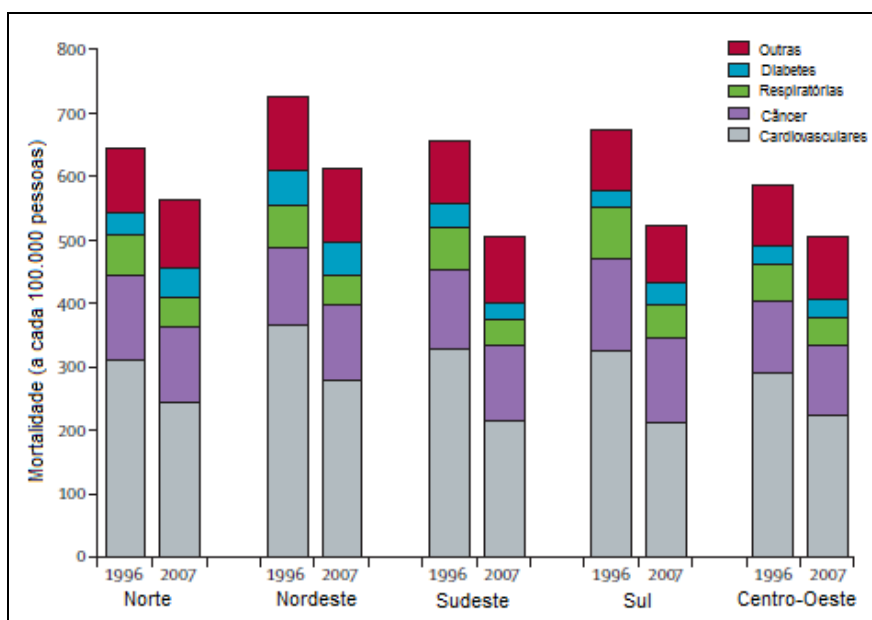
Em 2008, 17,3 milhões de pessoas morreram de DCVs, sendo 7,3 milhões de mortes decorrentes de infarto agudo do miocárdio e 6,2 milhões por acidente vascular cerebral. Para 2030, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que esse número suba para 23,6 milhões (WHO, 2013).

Entre as doenças não transmissíveis, as DCVs são responsáveis por 48% dos óbitos, ultrapassando o câncer (21%), doenças respiratórias (12%), diabetes mellitus (3%) e outras doenças não transmissíveis (16%), como mostra a Figura 2 (WHO, 2011).



**Figura 2.** Distribuição das principais causas de morte por doenças não transmissíveis no mundo (adaptado de WHO, 2011a).

No Brasil, as doenças não transmissíveis representaram 58% das mortes registradas em 2007. A Figura 3 mostra que entre essas enfermidades, as DCVs foram, e continuam sendo, as principais responsáveis pelo maior número de óbitos em todas as regiões do País (SCHMIDT et al., 2011).



**Figura 3.** Índice de mortalidade por doenças não transmissíveis nas regiões do Brasil, em 1996 e 2007 (adaptado de SCHMIDT et al., 2011).

De acordo com o Ministério da Saúde, no ano de 2009, ocorreram 193.309 mortes por DCVs atribuíveis à aterosclerose, em indivíduos acima de 30 anos, sendo que 95.449 dessas mortes foram causadas por doenças isquêmicas do coração e 97.860, por doenças cerebrovasculares (MANSUR, FAVARATO, 2012).

Embora represente a principal causa de morte no País, vale ressaltar que o número de mortes por DCVs vem caindo nos últimos dez anos, principalmente nas regiões sul e sudeste e na faixa etária acima de 60 anos (SCHMIDT et al., 2011; MANSUR, FAVARATO, 2012). Entretanto, o índice de mortalidade do Brasil ainda permanece alto, quando comparado aos demais países da América do Sul, além de alguns países da América do Norte e Europa, como EUA, Portugal e Reino Unido (SCHMIDT et al., 2011).

Além do impacto social das DCVs no País e no mundo, a necessidade de internação hospitalar, atendimento e acompanhamento ambulatorial, procedimentos cirúrgicos, métodos terapêuticos e de diagnóstico determinam,

também, relevante impacto econômico (RIBEIRO et al., 2005). Em 2004, gastaram-se, aproximadamente, 30,8 bilhões de reais com DCVs, sendo 36,4% desse valor com cuidados em saúde, 8,4% com previdência social e 55,2% com a perda de produtividade. No total, o custo com DCVs representa 8% do gasto total com a saúde no País e corresponde a 1,74% do produto interno bruto (PIB) (AZAMBUJA et al., 2008).

### 1.3 FATORES DE RISCO ENVOLVIDOS NO DESENVOLVIMENTO DAS DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Desde 1948, estudos epidemiológicos têm demonstrado que a maioria das DCVs pode ser atribuída a diversos fatores de risco. Esses fatores são classificados em reversíveis, podendo ser de natureza biológica (dislipidemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus e obesidade) ou comportamental (tabagismo, etilismo, hábitos alimentares inadequados e sedentarismo), e irreversíveis, como idade, gênero, histórico familiar e etnia (O'DONELL, ELOSUA, 2008; SANTOS et al., 2008; FARIAS JUNIOR et al., 2011). De acordo com a OMS, esses fatores são considerados fatores de risco clássicos e são responsáveis por 75% das DCVs do mundo (WHO, 2011b).

Com a evolução da ciência nos últimos anos, atualmente são associados mais de 300 novos fatores de risco ao desenvolvimento de DCVs (PRASAD et al., 2010). Entre eles, podem-se citar: níveis elevados de proteína C-reativa (FERRANTI, RIFAI, 2002; SANTOS et al., 2003); fibrinogênio sérico elevado (PARASKEVAS et al., 2008); infecção e doença periodontal (CARALLO et al., 2010); resistência à insulina e estresse oxidativo (FERRANINI, IOZZO, 2006; HAIDARI et al., 2010). Muitos desses fatores de risco não são tão novos, entretanto, assim como os fatores que surgiram recentemente, precisam ser mais bem avaliados e mensurados (PRASAD et al., 2010; WHO, 2011b). Portanto, esses não serão abordados nessa revisão.

É importante ressaltar que a existência de um fator de risco não implica necessariamente o aparecimento de uma doença cardiovascular. No entanto, por ser uma doença de origem multifatorial, a presença de vários desses fatores aumenta, consideravelmente, essa possibilidade. Vale lembrar que

conhecer e detectar fatores de risco envolvidos é extremamente importante para definir o risco cardiovascular e delinear estratégias de intervenção contra essas doenças (LAHOZ, MOSTAZA, 2007).

Nesta revisão só se discutirá a dislipidemia, pois além de ser um dos principais fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose, está estritamente relacionada ao presente trabalho. As referências que discutem sobre os fatores irreversíveis podem ser encontradas no Quadro 1. As referências que discutem sobre os demais fatores de risco reversíveis estão no Quadro 2 (dentro do tópico 1.3.2).

### 1.3.1 Fatores de risco irreversíveis

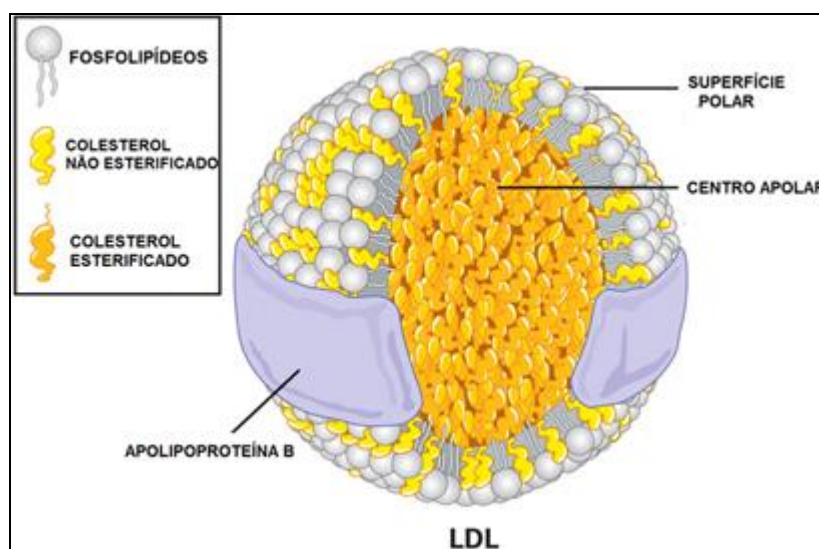
**Quadro 1.** Fatores de risco irreversíveis envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose

Fator de Risco	Comentário	Referência
Idade	<p>A incidência de DCVs aumenta com a idade independente do sexo ou etnia.</p> <p><u>Idade de risco:</u> Homens: acima de 45 anos Mulheres: acima 55 anos</p>	LAHOZ, MOSTAZA, 2007.
Gênero	<p>O número de mortes no mundo por DCVs é maior em homens que em mulheres. Entretanto, como as mulheres normalmente desenvolvem essas doenças entre 7 a 10 anos mais tarde que os homens, o risco de comorbidades, como diabetes e hipertensão arterial, é maior. Portanto, as consequências de uma DCV em mulheres tendem a ser mais graves em relação aos homens.</p>	<p>SCHENCK-GUSTAFSSON, 2009. TAN, GAST, SCHOUW, 2010. WHO, 2011a.</p>
Histórico familiar	<p>Os fatores de risco mais importantes associados ao desenvolvimento de DCVs são de origem genética, como a hipertensão, dislipidemia e diabetes. Além disso, a influência da família nos hábitos de vida do indivíduo também deve ser considerada no desenvolvimento da doença (tabagismo, sedentarismo e hábitos alimentares inadequados).</p> <p>Em estudo realizado em 2004, foi observado que das 109 crianças e adolescentes com história familiar de DCV prematura, 41,1% apresentaram um ou mais fatores de risco para a aterosclerose.</p>	<p>SANTOS et al., 2008. CROUCH, GRAMLING, 2005. BANERJEE, 2012.</p>
Etnia	<p>A população sul-asiática tem maior prevalência e mortalidade por DCVs entre os grupos étnicos, tais como caucasianos, negros africanos, judeus israelenses, malaios, chineses e japoneses, independentemente de suas filiações religiosas e estilo de vida.</p>	<p>FOROUHI, SATTAR, 2006. PRASAD et al., 2010.</p>





As lipoproteínas plasmáticas são complexos moleculares de proteínas transportadoras denominadas apolipoproteínas em combinação com fosfolipídios, colesterol, ésteres de colesterol e triglicerídeos (TG) (Figura 5). As apolipoproteínas (proteínas livres) se combinam com os lipídeos formando estrutura globular lipoproteica, que varia em tamanho, densidade, composição e função no organismo. De acordo com essas características, as lipoproteínas podem ser divididas em quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (NELSON, COX, 2002; FORTI, DIAMENT, 2006).



**Figura 5.** Estrutura de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL).

Fonte: [http://www2.uah.es/mapa/seminarios/activos/U.Mayores/Lipoproteinas/pages/LDL\\_jpg.htm](http://www2.uah.es/mapa/seminarios/activos/U.Mayores/Lipoproteinas/pages/LDL_jpg.htm)

Evidências clínicas comprovam alta correlação entre níveis elevados de LDL e níveis reduzidos de HDL com a incidência de doenças cardiovasculares (PENALVA et al., 2008). As LDL são responsáveis por transportar o colesterol produzido pelo fígado para os demais tecidos periféricos (NELSON, COX, 2002). Durante a passagem pela corrente sanguínea, essas lipoproteínas podem se depositar na parede arterial lesionada, onde sofrem processo de oxidação, iniciando a formação da placa de ateroma. Por essa razão, as LDL são conhecidas como lipoproteínas aterogênicas e seus níveis elevados (hipercolesterolemia) implicam maior risco de acúmulo de colesterol na camada íntima arterial,

favorecendo o desenvolvimento da aterosclerose (INSULL Jr, 2009). As IDL e as VLDL, precursoras da LDL, também são consideradas lipoproteínas aterogênicas (SBC, 2007).

De acordo com Tsofanidi e colaboradores (2010), as HDL possuem efeito antiaterogênico. Isso porque essas moléculas realizam o transporte reverso do colesterol, ou seja, removem o colesterol em excesso dos tecidos periféricos, transportando-os de volta para o fígado. Essa remoção inclui os lipídeos internalizados em macrófagos da placa de ateroma. Dessa maneira, as HDL são consideradas antitrombóticas por amenizarem a progressão da aterosclerose.

Sendo assim, o desequilíbrio dos níveis dessas lipoproteínas no organismo torna-se importante fator de risco para o desenvolvimento de DCVs, já que o colesterol é o principal componente da placa de ateroma. Esse desequilíbrio, denominado dislipidemia, pode ocorrer quando há interferência de fatores ambientais e/ou genéticos na produção, catabolismo ou na depuração plasmática de lipoproteínas circulantes (RABELO, 2001). Os desequilíbrios podem ser classificados como primários, quando sua origem for genética (hipercolesterolemia familiar), ou secundários, quando fatores ambientais são os causadores do fenótipo (MALLOY, KANE, 2007).

A IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose (2007) preconiza que os níveis de colesterol ligado à LDL (LDL-C) iguais ou superiores a 160 mg/dL (hipercolesterolemia isolada), de triglicérides (TG) iguais ou acima de 150 mg/dL (trigliceridemia isolada) ou ambos os níveis elevados (hiperlipidemia mista) representam risco no desenvolvimento de DCVs. A redução dos níveis de colesterol ligado à HDL (HDL-C) para valor menor ou igual a 40 mg/dL para homens e menor ou igual a 50 mg/dL para mulheres, redução isolada ou em associação com aumento dos níveis LDL-C e TG, também representa importante fator de risco cardiovascular (SBC, 2007).

## 1.3.2.2 Outros fatores de risco reversíveis

**Quadro 2.** Fatores de risco reversíveis envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose.

Fator de Risco	Comentário	Referência
Hipertensão arterial sistêmica (HAS)	O mecanismo pelo qual a HAS favorece a evolução da aterosclerose é pouco conhecido. Entretanto, acredita-se que além das alterações morfológicas no endotélio, os níveis elevados de angiotensina II possam estimular a proliferação de células do músculo liso e favorecer a aterogênese. Além disso, a angiotensina II parece ter ação pró-inflamatória, estimulando a formação de radicais livres no plasma e reduzindo a formação de óxido nítrico pelo endotélio. Por sua vez, essa redução de óxido nítrico, aumenta a adesão leucocitária ao endotélio e a resistência periférica, dificultando a perfusão sanguínea.	LAHOZ, MOSTAZA, 2007 ROMÁN, BADILLA, DUSSAUBAT, 2010
Tabagismo	Diversos efeitos do tabagismo podem ser associados ao desenvolvimento da aterosclerose, sendo os principais: alteração morfológica e bioquímica do endotélio; excesso de peroxidação lipídica por meio de radicais livres presentes no cigarro; desestabilização das placas de ateroma e aumento da atividade de coagulação e agregação plaquetária. Vale ressaltar que esses efeitos são válidos também para os fumantes passivos.	ERHARDT, 2009
Diabetes mellitus	Os mecanismos pelos quais essa condição influencia na progressão de DCVs não são totalmente elucidados. Aparentemente, a hiperglicemia favorece a glicosilação de partículas de LDL-C, tornando-as mais suscetíveis a sofrerem oxidação e, portanto, formando partículas mais aterogênicas e com meia-vida maior. Em contrapartida, partículas de HDL-C glicosiladas possuem meia-vida reduzida e perdem sua característica antiaterogênica.	DOKKEN, 2008 HEINONEN, 2011

**Quadro 2.** Fatores de risco reversíveis envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose. (cont.)

Fator de Risco	Comentário	Referência
Obesidade	A obesidade é frequentemente associada a comorbidades que representam fatores de risco estabelecidos para o desenvolvimento de DCVs, como diabetes mellitus, HAS e dislipidemia. Em adição, nos últimos anos, essa condição tem sido encarada como um fator de risco independente e os mecanismos envolvidos estão em estudo. Uma das hipóteses é que o tecido adiposo possa atuar de maneira similiar a uma célula endócrina, liberando citocinas e moléculas de adesão, representando uma fonte de mediadores pró-inflamatórios que influenciam na lesão endotelial, favorecendo a aterogênese.	GOMES et al., 2010 MARINO et al., 2010 ZALESIN et al., 2011
Sedentarismo	Apesar dos mecanismos desconhecidos, sabe-se que a prática regular de atividade física pode reduzir a incidência de DCVs. Esse efeito benéfico parece estar associado com a desaceleração da aterogênese, melhoria da disfunção endotelial e do processo inflamatório. Em adição, a prática de atividades físicas pode controlar vários fatores de risco associados como diabetes melitus, HAS e obesidade. A <i>American Heart Association</i> recomenda no mínimo 30 minutos de atividade física diária e moderada na prevenção primária de DCVs.	AHMED et al., 2012 SHO-JEN et al., 2013
Alimentação	É comprovado que dietas ricas em colesterol, gorduras saturadas, gordura- <i>trans</i> , açúcar refinado, sal e baixo consumo de frutas, vegetais e fibras aumentam o risco cardiovascular, contribuindo diretamente com os fatores de risco associados como a obesidade, hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes mellitus.	CERVATO et al., 1997 WHO, 2011a FROHLICH, ALSARRAF, 2013

#### 1.4 FISIOPATOLOGIA DA ATEROSCLEROSE

A compreensão molecular da fisiopatologia da aterosclerose é fragmentada e os dados presentes na literatura são controversos. Entretanto, sabe-se que existe correlação entre o acúmulo de lipídeos na camada subendotelial, oxidação lipídica e o processo inflamatório (INSULL Jr, 2009).

O endotélio vascular apresenta papel central no desenvolvimento da aterosclerose. Em condições fisiológicas, as células endoteliais atuam como barreira física, impedindo a passagem livre de moléculas e outras células para o interstício. Além disso, essas células produzem substâncias vasodilatadoras (como o óxido nítrico) e vasoconstritoras (angiotensina II e endotelina), que, quando em equilíbrio, são capazes de manter o tônus vascular. O endotélio também é responsável por manter o fluxo sanguíneo laminar, inibir a adesão e agregação plaquetária, a proliferação de células do músculo liso, a coagulação sanguínea e controlar a resposta inflamatória, mantendo uma superfície com características antitrombóticas (BAHIA et al., 2006; KAPERONIS et al., 2006; CHAPMAN, 2007).

A aterogênese (Figura 6), processo de formação da placa de ateroma, é iniciada quando a função normal do endotélio é comprometida por uma lesão. Como discutido anteriormente, diversos fatores de risco reversíveis e irreversíveis podem ocasionar lesão nas células endoteliais e favorecer o desenvolvimento da aterosclerose (SANTOS et al., 2008). Quando essas células estão lesadas, a função protetora do endotélio é comprometida e a atividade vasoconstritora se superpõe à atividade vasodilatadora (BAHIA et al., 2006; TOTH, 2008).

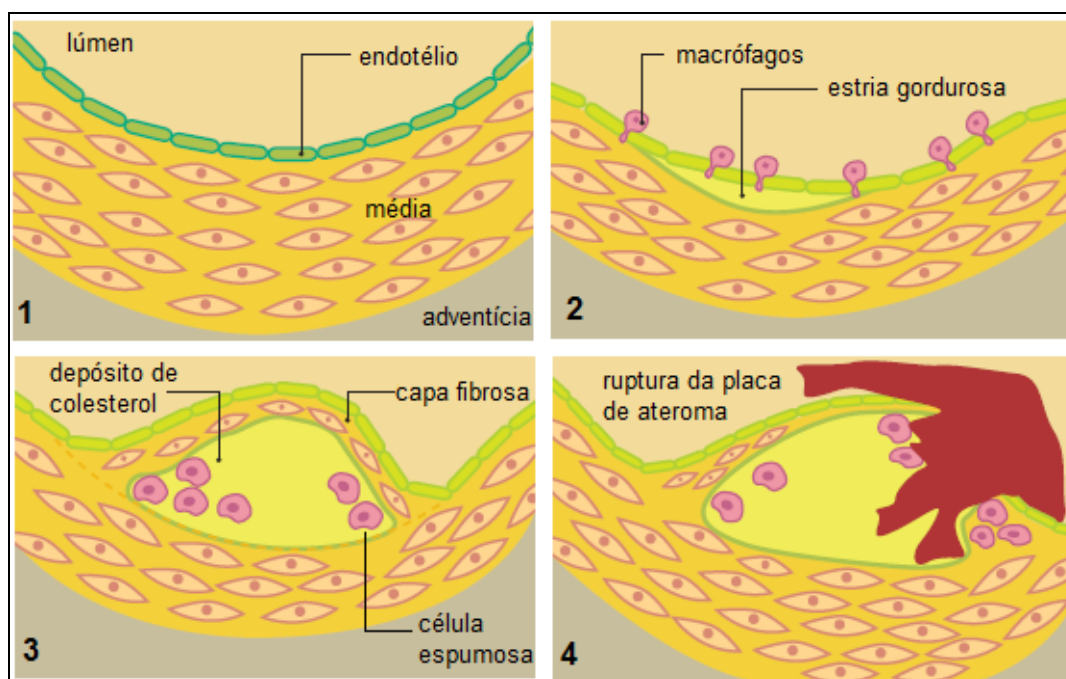
A partir da disfunção do endotélio, a infiltração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) na camada íntima das artérias é facilitada. Sendo assim, o nível de LDL-C circulante no organismo é um fator determinante no desenvolvimento da doença, pois quanto maior esse nível, maior seu acúmulo na camada subendotelial (INSULL Jr, 2009). Essas moléculas de LDL-C depositadas na camada íntima sofrem oxidação através de enzimas como a 5'-lipoxigenase, fosfolipase A2 e

mieloperoxidase (TOTH, 2008). As partículas de LDL-C oxidadas (LDL-Cox) tornam-se pró-inflamatórias, ativando o sistema imunológico inato do organismo. Essas partículas recrutam monócitos, que penetram na camada subendotelial e se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos, por sua vez, fagocitam as LDL-Cox formando as células espumosas, que quando acumuladas, dão origem às estrias gordurosas (CÔRREA-CAMACHO, DIAS-MELICIO, SOARES, 2007). A formação de estrias gordurosas na camada íntima arterial é o primeiro estágio que predispõe à progressão da placa de ateroma e pode se desenvolver ainda na infância ou adolescência (CASELA FILHO et al., 2003; INSULL Jr, 2009).

Uma vez formadas, as células espumosas estimulam a produção de citocinas, incluindo a interleucina-1 (IL-1), que induz a migração e proliferação das células do músculo liso da camada média arterial para a camada íntima. Na camada íntima, as células do músculo liso produzem matriz extracelular, que migra sobre a estria gordurosa formando a placa de ateroma (CASELA FILHO et al., 2003; KAPERONIS et al., 2006). Linfócitos T também podem se acumular na lesão aterosclerótica, contribuindo para o processo inflamatório crônico. Existem evidências de que as células do músculo liso, os linfócitos T e as células endoteliais expressam outras moléculas biologicamente ativas, que participam do crescimento da placa de ateroma, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ) e fator estimulante de colônias de monócitos (M-CSF), embora, o exato momento da expressão de cada uma delas ainda não tenha sido esclarecido (VERRI, FUSTER, 1997).

As placas de ateroma crescem lentamente de modo que os depósitos de colesterol, em adição à proliferação celular, formam placas grandes o suficiente para projetar-se para o lúmen da artéria, reduzindo o fluxo sanguíneo e podendo ocasionar oclusão total do vaso. Como consequência, a disponibilidade de oxigênio para os tecidos é reduzida e, então, ocorrem as manifestações clínicas (CARVALHO et al., 2010). Outro agravante da placa aterosclerótica é a sua estabilidade. As placas de capa fibrosa fina, com poucas células do músculo liso e ricas em lipídeos e células inflamatórias são instáveis e podem se romper. O

rompimento das placas de ateroma leva à exposição imediata do seu conteúdo para a corrente circulatória, ativando plaquetas e fatores de coagulação, que levam à formação do trombo, principal mediador de eventos vaso-oclusivos. Quando suficientemente grande, o trombo pode obstruir artérias importantes ligadas ao cérebro e ao coração, levando a eventos isquêmicos graves como AVC, infarto agudo do miocárdio ou até mesmo a morte do paciente (TOTH, 2008).



**Figura 6.** Resumo da aterogênese: (1) artéria normal (2) lesão endotelial, recrutamento de macrófagos e formação da estria gordurosa; (3) formação da capa fibrosa sobre a lesão; e (D) ruptura da placa de ateroma (adaptado de CHANNON, 2002).

## 1.5 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

### 1.5.1 Fármacos hipolipemiantes

De acordo com a IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2007), todos os pacientes com dislipidemia e risco cardiovascular devem receber orientações sobre medidas não farmacológicas, ou seja, relacionadas ao estilo de vida. Normalmente, as medidas dietéticas são as primeiras a serem instituídas podendo,



inclusive, eliminar a necessidade do uso de fármacos (SBC, 2007). Em contrapartida, para alguns casos especiais como hipercolesterolemia de origem genética e em pacientes que já desenvolveram doença vascular coronariana ou periférica, só alterações no estilo de vida não são suficientes e o emprego da terapia farmacológica é necessário.

As mudanças no estilo de vida e alimentação não serão detalhadas nessa revisão, mas é importante ressaltar que estas são indispensáveis e devem ser adotadas em paralelo ao tratamento farmacológico, para que este atinja seu pleno potencial (MALLOY, KANE, 2007).

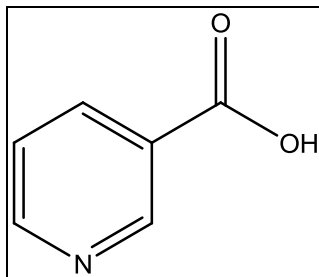
#### 1.5.1.1 Ácido nicotínico

O ácido nicotínico (Figura 7) foi o primeiro fármaco introduzido na terapêutica para o tratamento de dislipidemias. Também conhecido por niacina ou vitamina B3, o ácido nicotínico é obtido a partir da oxidação da molécula de nicotina (STACH et al., 2012). A niacina age em múltiplos alvos e tecidos para modular o perfil lipídico e seus efeitos são dependentes de altas doses. No tecido adiposo, o ácido nicotínico atua inibindo a lipólise, levando, em poucas horas, a menor liberação de ácidos graxos na corrente circulatória. Como consequência, ocorre redução do fornecimento de substrato para a síntese hepática de triglicerídeos e mais especificamente, partículas de VLDL, precursora da LDL. Em adição, a niacina possui efeito direto sobre os hepatócitos, bloqueando a diacilglicerol aciltransferase-2 (DGAT-2), enzima chave na síntese hepática de triglicerídeos. Quando essa enzima é inibida, ocorre um aumento na degradação de apolipoproteína B e diminuição da secreção de VLDL e LDL no plasma (ROZMAN, MONOSTORY, 2010).

Sua atividade é favorável na redução de 15 a 30% de LDL e 20 a 40% de TG. Além disso, a niacina pode aumentar os níveis de HDL em 15 a 30%. Estudos clínicos demonstraram que o ácido nicotínico sozinho ou combinado com outros agentes hipolipemiantes pode reduzir

significativamente a mortalidade e complicações cardiovasculares da aterosclerose (STACH et al., 2012).

Os principais efeitos adversos da niacina são rubor, prurido, hiperuricemia, hiperglicemia e hepatotoxicidade (CHAPMAN et al., 2010). Recomenda-se a dose inicial de 500 mg ao dia com aumento progressivo para até 1 a 2 g diárias (SBC, 2007).



**Figura 7.** Estrutura do ácido nicotínico.

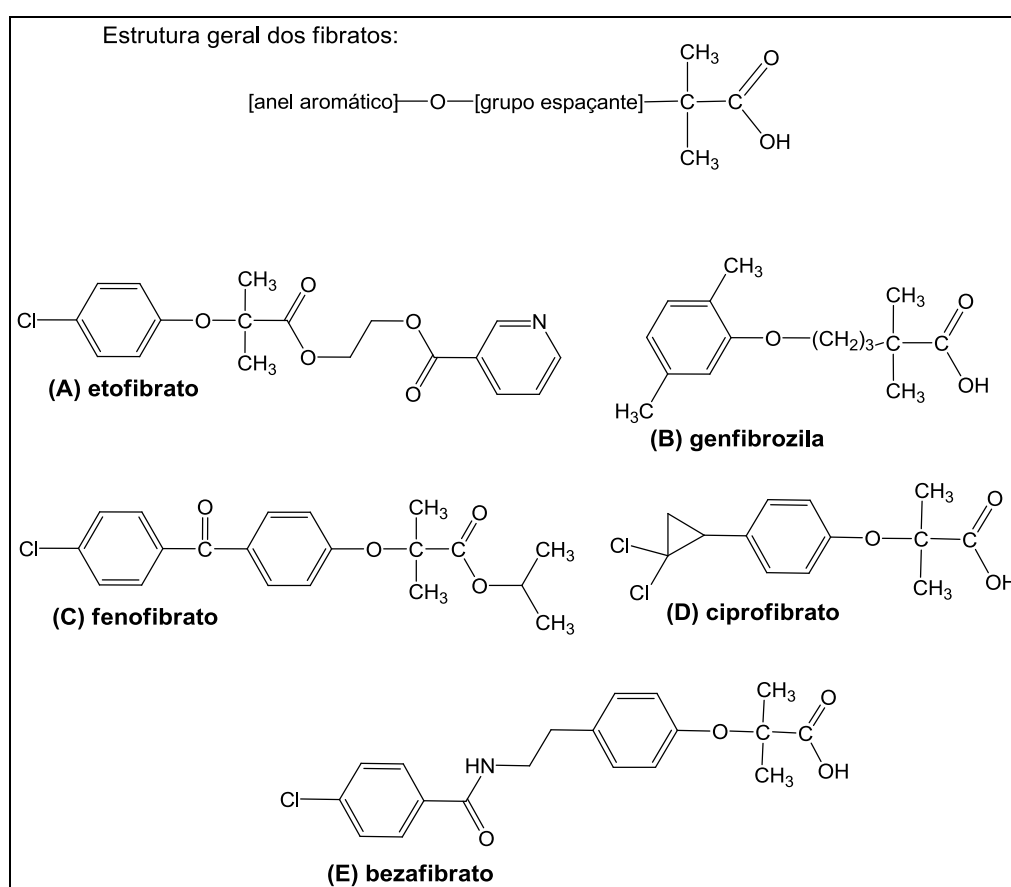
#### 1.5.1.2 Fibratos

Os fibratos estão disponíveis na terapêutica desde 1970 (STEINER, 2005). Entretanto, o mecanismo de ação desses derivados de ácido fólico não é totalmente elucidado. Acredita-se que eles possam agir estimulando receptores nucleares denominados receptores ativados por proliferadores de peroxissomas do tipo alfa (PPAR- $\alpha$ ) (CHAPMAN et al., 2010). Como consequência desse estímulo, ocorre modulação na expressão de vários genes relacionados ao metabolismo e transporte das lipoproteínas. Sua atividade é favorável na redução de 30 a 50% dos TG, podendo também reduzir os níveis de LDL e aumentar os níveis de HDL entre 5 e 6% (SBC, 2007; STEINER, 2005).

A Figura 8 mostra a estrutura geral dos derivados do ácido fólico. Os fibratos são análogos do ácido fenoxiisobutírico. A relação entre estrutura e atividade biológica não é bem esclarecida, mas sabe-se que a porção ácida isobutírica é essencial para a atividade e que fibratos esterificados nessa porção são pró-fármacos e requerem metabolização *in vivo* para exercerem sua atividade biológica. Em adição, a introdução de cloro na posição para do anel aromático ou anel isopropílico ligado a duas moléculas de cloro produz compostos com meia-vida relativamente

elevada. O grupo espaçante é opcional e, portanto, não interfere com a atividade destes compostos (HARROLD, 2008).

No Brasil, os fármacos dessa classe disponíveis na terapêutica são o etofibrato, genfibrozila, fenofibrato, ciprofibrato e bezafibrato (Figura 8). As doses recomendadas variam entre 100 a 1200 mg/dia, dependendo do fibrato utilizado. Alguns efeitos adversos de fármacos dessa classe são distúrbios gastrointestinais, mialgia, astenia, litíase biliar, diminuição da libido, erupção cutânea, prurido, cefaleia e perturbação do sono (SBC, 2007).



**Figura 8.** Estrutura geral e fibratos disponíveis na terapêutica: (A) etofibrato; (B) genfibrozila; (C) fenofibrato; (D) ciprofibrato e (E) bezafibrato.

### 1.5.1.3 Sequestrantes de ácidos biliares

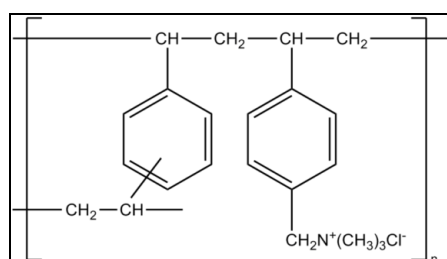
Os ácidos biliares, moléculas sintetizadas a partir do colesterol, são indispensáveis para a absorção intestinal de nutrientes e vitaminas

lipossolúveis e representam uma importante via de eliminação do colesterol no organismo (POREZ et al., 2012).

Os sequestrantes de ácidos biliares ou resinas de troca iônica são estruturas poliméricas com carga positiva (sítios de amônio quaternário ou aminas protonáveis no pH intestinal), que se ligam nos ácidos e nos sais biliares intestinais (INSULL Jr, 2006). Essa ligação compromete a circulação entero-hepática dos ácidos biliares, aumentando sua excreção fecal em até três vezes mais que o normal. Para manter a homeostase do organismo, o citocromo P450 7A1 (CYP7A1) é estimulado a aumentar a síntese de ácidos biliares à custa do colesterol plasmático. Em contrapartida, ocorre o aumento na expressão de receptores específicos de LDL nos hepatócitos, que vão induzir a depuração de LDL plasmático, reduzindo o nível dessa lipoproteína aterogênica na corrente circulatória (INSULL Jr, 2006; OUT, GROEN, BRUFAU, 2012).

O efeito desses fármacos na redução do colesterol é variável. Em média, os sequestrantes de ácidos biliares podem reduzir entre 9 a 28% do valor de LDL e, ocasionalmente, podem proporcionar leve aumento dos níveis de HDL (0-9%) (OUT, GROEN, BRUFAU, 2012). A associação com estatinas pode potencializar o efeito hipolipemiante dessas resinas (SBC, 2007).

Os fármacos dessa classe (colestiramina, colestipol e colesevelam) estão disponíveis na terapêutica desde 1973. Entretanto, no Brasil, somente a colestiramina (Figura 9) é comercializada. A dose inicial recomendada pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007) é de 4 g/dia, podendo atingir até, no máximo, 24 g/dia. Os efeitos adversos são pouco tolerados e os mais comuns são distúrbios gastrointestinais como desconforto abdominal, constipação, náusea, inchaço, flatulência e intensificação de hemorroidas (SBC, 2007; HOU, GOLDBERG, 2008).



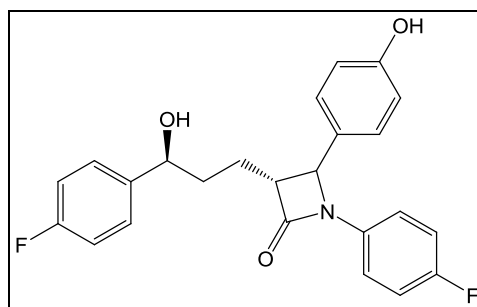
**Figura 9.** Estrutura da colestiramina.

#### 1.5.1.4 Inibidor da absorção de colesterol

Essa classe de fármacos é representada pela ezetimiba (Figura 10), o primeiro e, até então, único inibidor da absorção de colesterol presente na terapêutica. A ezetimiba atua inibindo a absorção intestinal de colesterol biliar e da dieta através da sua ligação em uma proteína específica localizada na borda escovada do intestino delgado, denominado NPC1L1. A inibição dessa proteína faz com que o colesterol permaneça no lúmen intestinal, sendo eliminado pelas fezes. Em adição, como mecanismo compensatório ao decréscimo de colesterol plasmático, ocorre aumento na expressão de receptores de LDL nos hepatócitos, aumentando a depuração dessa lipoproteína e reduzindo sua concentração no plasma (ROZMAN, MONOSTORY, 2010).

A dose recomendada de ezetimiba é de 10 mg/dia, sem quaisquer restrições de horário e alimentação, pois seu mecanismo de ação é seletivo e não prejudica a absorção de TG, vitaminas lipossolúveis e outros nutrientes (SBC, 2007). Como monoterapia, a ezetimiba é capaz de reduzir de 17 a 22% dos níveis de LDL. Entretanto, é comum a associação com inibidores da HMG-CoA redutase pelos efeitos aditivos observados na redução das lipoproteínas aterogênicas (HOU, GOLDBERG, 2009; RIZZO et al., 2009; ROZMAN, MONOSTORY, 2010).

A ezetimiba é um fármaco bem tolerado e os efeitos adversos como diarreia e fadiga são raros e, por essa razão, tem sido utilizada em pacientes que não toleram os efeitos gastrointestinais dos sequestrantes de ácidos biliares (HOU, GOLDBERG, 2009; RIZZO et al., 2009).



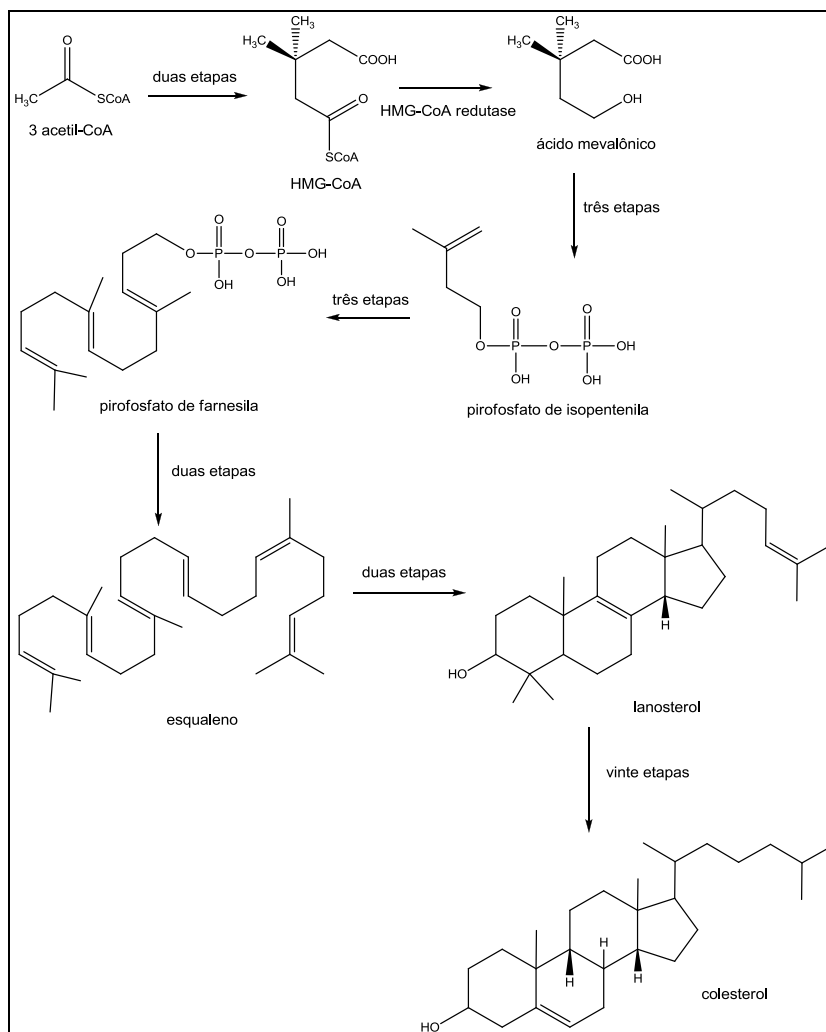
**Figura 10.** Estrutura da ezetimiba.

### 1.5.1.5 Inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase

Os inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase), também conhecidos como estatinas, revolucionaram o tratamento da dislipidemia devido à potente ação na redução dos níveis lipídicos em adição ao baixo índice de efeitos adversos (BRAUTBAR, BALLANTYNE, 2011). As estatinas atualmente são fármacos de primeira escolha na redução dos níveis de LDL para a maioria dos pacientes, podendo reduzir, também, os níveis de TG e induzir leve aumento de HDL (LINARELLI, POTT Jr, 2008; BRAUTBAR, BALLANTYNE, 2011).

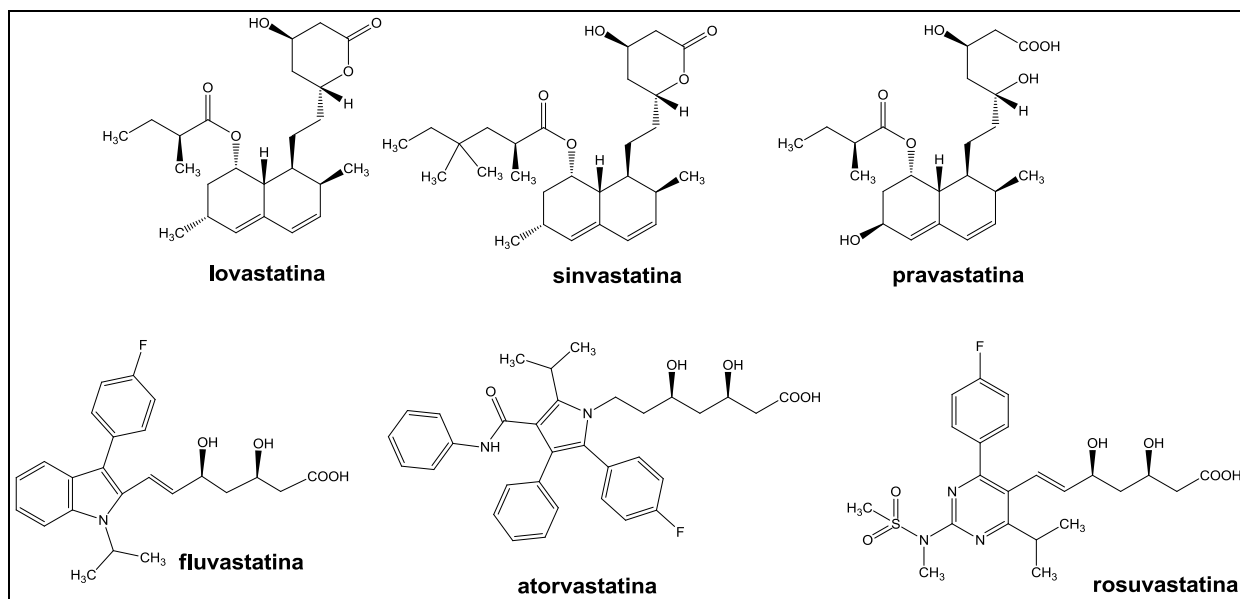
Os fármacos dessa classe atuam na biossíntese hepática do colesterol, mais especificamente na via do mevalonato, na qual a enzima HMG-CoA redutase exerce papel fundamental e limitante (WIERZBICKI, POSTON, FERRO, 2003; MALLOY, KANE, 2007). As estatinas, ao inibirem competitivamente a HMG-CoA redutase, impedem a conversão do substrato HMG-CoA em ácido mevalônico, comprometendo uma das etapas iniciais da síntese de colesterol pelo fígado (Figura 11). Como consequência do bloqueio da síntese hepática de colesterol, os níveis de VLDL, IDL e, principalmente, LDL, são reduzidos. A redução de lipoproteínas circulantes induz a expressão de receptores de superfície específicos de LDL nos hepatócitos, que, por sua vez, liga-se à LDL e, também, à VLDL e IDL, aumentando a depuração dessas moléculas. Dessa maneira, o mecanismo de ação das estatinas é considerado duplo, pois além da redução da biossíntese de colesterol, a expressão de receptores de LDL hepáticos aumenta a depuração das lipoproteínas aterogênicas circulantes, reduzindo o nível de colesterol plasmático (FIEGENBAUM, HUTZ, 2006; CAMPO, CARVALHO, 2007; LINARELLI, POTT JR, 2008).

Recentemente, outros efeitos benéficos ao sistema cardiovascular têm sido associados ao uso de estatinas. Os efeitos pleiotrópicos, como assim são chamados, independem da inibição da enzima alvo e incluem a melhoria da função endotelial por aumento da produção de óxido nítrico, atividade antiinflamatória, antitrombótica e antioxidante (LUVAI et al., 2012).



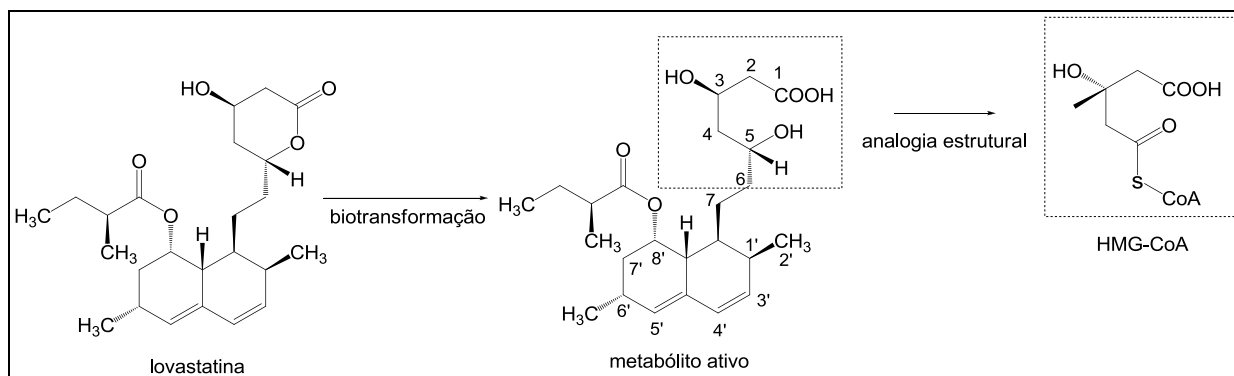
**Figura 11.** Resumo da síntese hepática do colesterol (adaptado de CAMPO, CARVALHO, 2007).

A lovastatina, primeira estatina introduzida na terapêutica, foi aprovada em 1987, pelo FDA (*U.S Food and Drug Administration*) (TOBERT, 2003). Desde então, as estatinas vêm despertando o interesse da indústria farmacêutica. Atualmente, o arsenal terapêutico conta com sete fármacos dessa classe, que podem ser divididos de acordo com a sua origem (Figura 12). As estatinas de origem natural são representadas pela lovastatina e pela pravastatina, a sinvastatina tem origem semissintética, enquanto que a fluvastatina, a atorvastatina, a rosuvastatina e a pitavastatina são totalmente sintéticas. Dessas sete, somente a pitavastatina não está disponível no Brasil (FONSECA, 2005; BRAUTBAR, BALLANTYNE, 2011).



**Figura 12.** Estatinas disponíveis na terapêutica nacional.

A relação entre a estrutura e atividade das estatinas é bem definida. A atividade biológica dos inibidores da HMG-CoA redutase pode ser justificada pela semelhança estrutural desses compostos com a HMG-CoA, substrato natural da enzima (Figura 13) (CAMPO, CARVALHO, 2007).



**Figura 13.** Semelhança estrutural entre o metabólito ativo da lovastatina e o substrato natural da enzima HMG-CoA redutase (HMG-CoA).

No geral, a estrutura dos inibidores da HMG-CoA redutase é composta por grupos lipofílicos ligados a cadeia lateral comum, representada pelo ácido heptanóico 3,5-diidroxilado. Essa cadeia é indispensável para a atividade biológica, sendo a porção responsável pela ligação ao sítio catalítico da enzima. Além da presença dessa cadeia, outras condições estruturais são necessárias para a atividade



hipolipemiante das estatinas, sendo elas (CAMPO, CARVALHO, 2007; HARROLD, 2008):

- estatinas que contêm lactona na sua estrutura, como a lovastatina e a sinvastatina, são pró-fármacos do tipo bioprecusores e devem ser metabolizadas em sua forma ativa, liberando o ácido heptanóico 3,5-diidroxilado, para interação no sítio catalítico enzimático;

- estereoquímica das hidroxilas do C<sub>3</sub> e do C<sub>5</sub> deve ser igual à encontrada no metabólito ativo da lovastatina para que ocorra a inibição enzimática;

- a distância de dois carbonos entre o C<sub>5</sub> e o sistema de anéis é importante para a atividade e qualquer alteração nessa porção da molécula leva à perda ou à redução da atividade biológica;

- a dupla ligação entre o C<sub>6</sub> e o C<sub>7</sub> pode aumentar ou reduzir a atividade, dependendo do sistema de anéis presentes na estrutura. A ligação simples entre esses carbonos favorece a atividade quando o sistema de anéis for decalíneo, como o da lovastatina, ou for algum heterocíclico específico, como o pirrol da atorvastatina. Já a ligação dupla favorece a atividade biológica de estatinas com outros sistemas de anéis, como o da fluvastatina e da rosuvastatina;

- alterações no sistema de anéis (grupo lipofílico) podem preservar a atividade biológica quando o anel decalíneo (lovastatina, sinvastatina e pravastatina) for substituído pelo anel indólico (fluvastatina), pirrol (atorvastatina) ou pirimidina (rosuvastatina). Esses grupos volumosos são importantes por conduzirem a interações hidrofóbicas com a enzima.

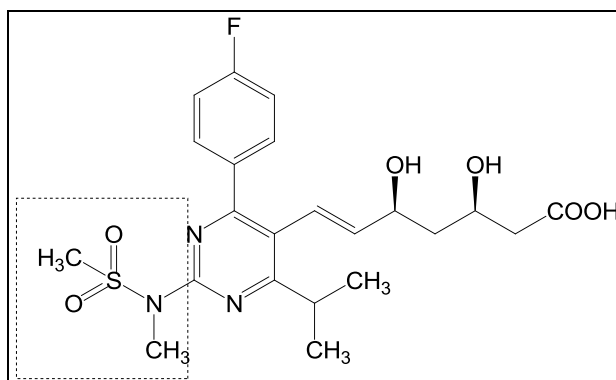
A reação adversa mais relevante das estatinas é a miopatia, caracterizada pela dor muscular intensa e fraqueza, acompanhada do aumento dos níveis de creatinoquinase. Quando em sua forma grave, denominada rabdomiólise, pode levar à hospitalização do paciente, além de induzir mioglobulinúria e falha renal. Entretanto, sua incidência é em menos 0,1% do pacientes e os sintomas desaparecem quando a terapia é interrompida. Os mecanismos pelos quais as estatinas induzem a rabdomiólise não são bem estabelecidos. Acredita-se que a depleção de outros isoprenóides que não o colesterol, provenientes da síntese

hepática, possa induzir esse mecanismo. Outra hipótese reportada na literatura é o acesso das estatinas lipofílicas aos tecidos extra-hepáticos, que podem danificar as células do músculo esquelético (TOBERT, 2003).

Entre os fármacos inibidores da HMG-CoA redutase, a rosuvastatina merece destaque, por reduzir os níveis de LDL-C entre 43 a 51% nas doses iniciais de 5 a 10 mg (CALZA, 2009).

A estrutura química da rosuvastatina (Figura 14) é composta por um grupo metanossulfonamida estável, polar e que lhe confere baixa lipofilicidade, o que parece limitar seu acesso ao músculo esquelético e reduzir os efeitos adversos musculares, além de favorecer a interação com o receptor por meio de ligação iônica (LUVAI et al., 2012).

A interação da rosuvastatina com a HMG-CoA redutase é quatro vezes maior em relação ao substrato natural. A afinidade aumentada pela enzima prolonga seu tempo de ação. O prolongamento da meia-vida foi observado em estudo comparativo realizado entre atorvastatina, sinvastatina e rosuvastatina. Este estudo mostrou que 7 horas após a administração oral desses fármacos em ratos, 62% das enzimas permaneciam inibidas, quando se administrou rosuvastatina, enquanto que para atorvastatina e para sinvastatina esse valor foi de 13 e 7%, respectivamente. Em adição, a concentração necessária para inibir 50% da síntese de colesterol nos hepatócitos de ratos ( $IC_{50}$ ) foi de 0,16 nM para a rosuvastatina, 1,16 nM para atorvastatina, 2,74 nM para a sinvastatina, 3,78 nM para fluvastatina e 6,93 nM para a pravastatina. Esses dados mostram que a rosuvastatina é o inibidor da HMG-CoA redutase mais potente disponível atualmente no Brasil, sendo recomendada tanto na prevenção primária, como secundária de doenças cardiovasculares (CALZA, 2009).



**Figura 14.** Estrutura da rosuvastatina com destaque para o grupo metanossulfonamida.

## 1.5.2 Agentes antitrombóticos

Cerca de 80% dos eventos cardiovasculares são decorrentes de uma oclusão trombótica. Como discutido anteriormente, a coagulação sanguínea e a agregação plaquetária são eventos importantes para a formação do trombo, mediador de eventos vaso-oclusivos agudos. Dessa maneira, a administração de agentes antitrombóticos (inibidores da agregação plaquetária e anticoagulantes sanguíneos), bem como de agentes fibrinolíticos, é altamente justificada, confirmada por diversos estudos clínicos e recomendada na prevenção primária ou secundária de DCVs (ROSITO, SILVA, FUCHS, 2000).

### 1.5.2.1 Cascata de coagulação e fármacos anticoagulantes

Quando o endotélio é danificado, ocorre ativação proteolítica sequencial de pró-enzimas por proteases do plasma, denominada cascata de coagulação, que tem como objetivo restabelecer a hemostase (FERREIRA et al., 2010; KING, HOLLEY, MOORES, 2013). De acordo com o novo modelo baseado em superfícies celulares, essa cascata pode ser dividida em quatro fases: iniciação, amplificação, propagação e finalização (Figura 15) (FERREIRA et al., 2010).

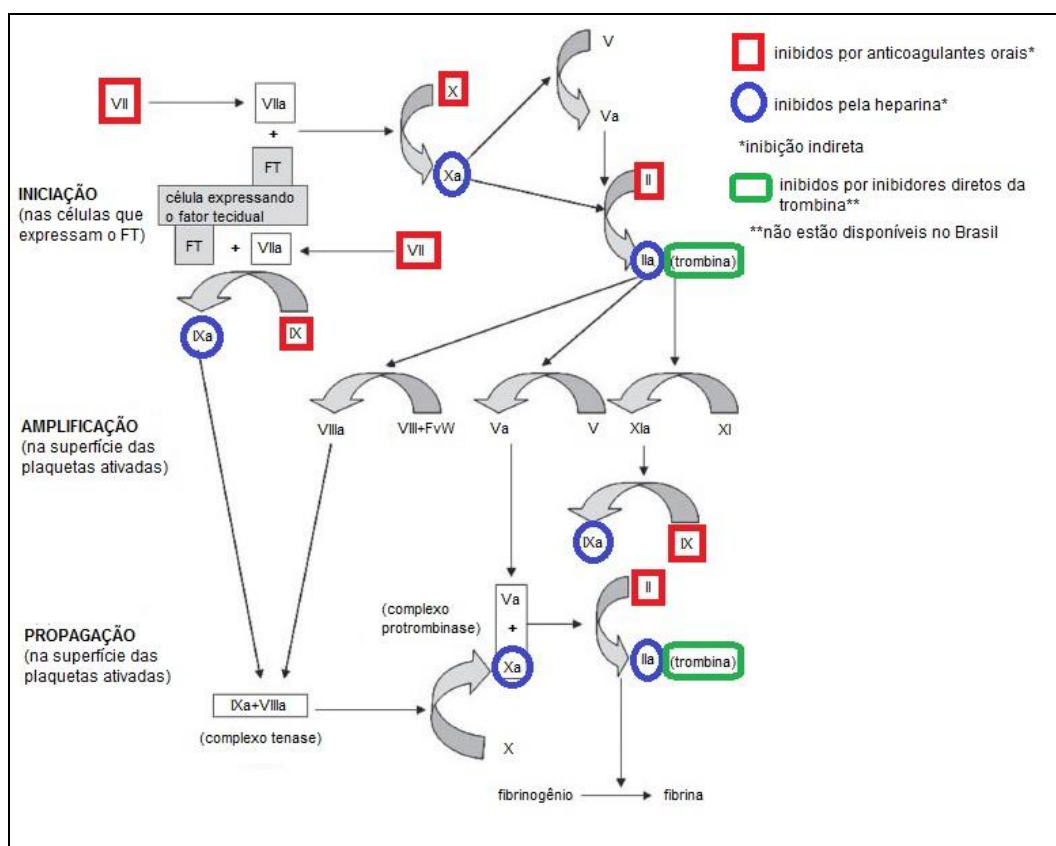
A fase de iniciação ocorre nas células da lesão endotelial que expressam uma proteína transmembrana denominada fator tecidual (FT).

O FT age como receptor e cofator para o fator VII sanguíneo, ativando-o e formando complexo FVIIa/FT, responsável pela ativação dos fatores de coagulação FIX e FX (obtendo-se os fatores FIXa e FXa). Quando ativado, o FXa associa-se com o seu cofator FVa, formando o complexo protrombinase. A protrombinase, por sua vez, é responsável por transformar a protrombina (FII) em trombina, que tem como principal função ativar as plaquetas e desencadear a agregação plaquetária no local da lesão. A trombina formada nessa primeira fase não é suficiente para a formação do coágulo de fibrina, mas é de fundamental importância para a segunda fase (fase de amplificação), onde além de ativar as plaquetas, vai ativar, também, os fatores de coagulação V, XI e VIII ligado ao fator de Von Willebrand (FVIII/FvW) que estão presentes na superfície plaquetária. Nessa segunda fase ocorre a dissociação do FVIII/FvW, que libera o FvW, responsável pela agregação plaquetária na lesão. (ZHENDER, 2007; FERREIRA et al., 2010).

Na fase de propagação ocorre um recrutamento de grande número de plaquetas para o sítio da lesão e produção do complexo tenase (FIXa+FVIIIa), que produz o Fxa. Esse fator interage com o fator Va nas plaquetas, dando origem ao complexo protrombinase na superfície plaquetária ativada, responsável por converter grande quantidade de protrombina em trombina. A trombina, agora em maior quantidade, vai clivar o fibrinogênio em monômeros de fibrina, que formam um polímero sobre a lesão (tampão plaquetário ou coágulo de fibrina) (FERREIRA et al., 2010).

Por fim, a última fase (fase de finalização), refere-se ao controle da coagulação na região da lesão. Para tanto, quatro anticoagulantes endógenos atuam evitando a oclusão trombótica do vaso: o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), que regula a fase inicial da cascata, inibindo a conversão de FVIIa/FT em fator Xa, e, portanto, limita a coagulação; proteína C (PC) e proteína S (PS), dependentes de vitamina K e que inativam os fatores procoagulantes FVa e FVIIIa por proteólise, sendo a PS é um cofator que aumenta a atividade da PC e a antitrombina (AT), responsável pela inibição de serinoproteases (FIXa, FXa, FXIa e FXIIa) e da trombina (ZHENDER, 2007; FERREIRA et al., 2010).

Os fármacos anticoagulantes podem atuar de maneira direta ou indireta na cascata de coagulação. Os fármacos que atuam de maneira direta, como os derivados de hirudina, argatrobana e ximelagatrana, não estão disponíveis na terapêutica nacional e, portanto, não serão discutidos nessa revisão (TERRA-FILHO, MENNA-BARRETO, 2010). Já os fármacos que atuam de maneira indireta, como é o caso dos antagonistas da vitamina K e da heparina, estão aprovados para uso no País e serão discutidos na sequência. Os alvos da ação desses fármacos estão representados na Figura 15.



**Figura 15.** Novo modelo de cascata de coagulação com destaque para os alvos de fármacos anticoagulantes (adaptado de FERREIRA et al., 2010).

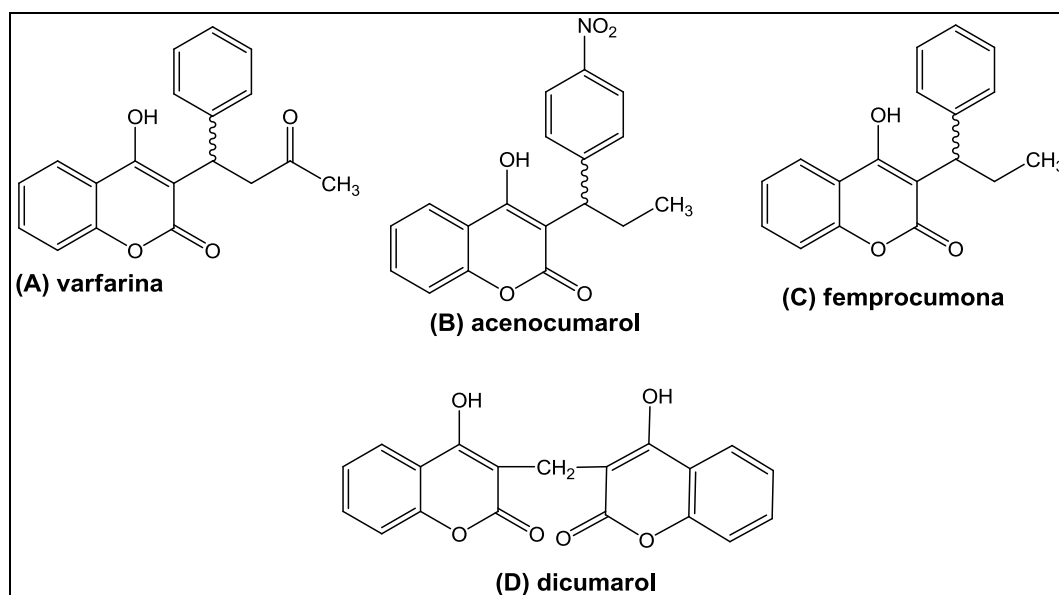
➤ Anticoagulantes orais: antagonistas da vitamina K

Os antagonistas da vitamina K são anticoagulantes orais utilizados há mais de 70 anos na profilaxia de eventos trombóticos.

Entretanto, possuem aplicação clínica limitada devido às inúmeras interações com outros fármacos e alimentos (SHAMEEM, ANSELL, 2013).

Os fármacos dessa classe atuam inibindo a enzima que converte o 2,3-epóxido da vitamina K (metabólito inativo) em vitamina K, que é necessária para a síntese de fatores de coagulação FII, FVII, FIX, FX e das proteínas anticoagulantes PC e PS. A inibição das proteínas PC e PS seria, teoricamente, adversa aos efeitos desejados, entretanto, esta diminuição é compatível com o efeito anticoagulante (HAMERSCHLAK, ROSENFELD, 1996). Dessa maneira, os antagonistas da vitamina K não possuem atividade anticoagulante intrínseca e inibem a coagulação de forma indireta (CATERINA et al., 2007; SHAMEEM, ANSELL, 2013).

A estrutura química desses compostos é derivada da 4-hidroxi cumarina. Os fármacos diferem em relação ao substituinte da posição 3 e meia-vida (Figura 16). Entre os derivados o mais utilizado é a varfarina e sua dose recomendada varia entre 2 a 5 mg/dia. O principal efeito adverso é a hemorragia, que normalmente ocorre quando altas doses de anticoagulante são administradas. Também, podem ocorrer reações de hipersensibilidade, náuseas, vômitos e diarreias (PINEDE *et al.*, 2001; TELES, FUKUDA, FEDER, 2012).



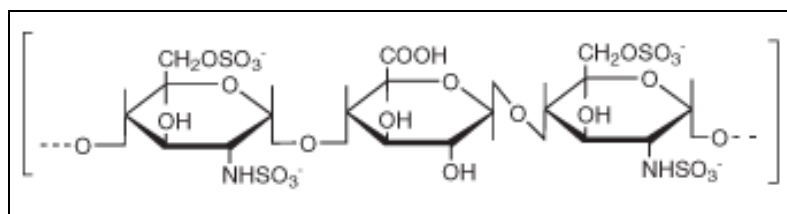
**Figura 16.** Estrutura química dos anticoagulantes derivados da 4-hidroxi cumarina: (A) varfarina; (B) acenocumarol; (C) femprocumona; (D) dicumarol.

➤ Inibidores indiretos da trombina: heparinas

Os fármacos da classe das heparinas (Figura 17) são estruturas polissacarídicas sulfatadas de uso parenteral, que podem ser de origem natural ou sintética. As heparinas de origem natural disponíveis na terapêutica são classificadas de acordo com a sua massa molecular em heparinas não fracionadas ou de alta massa molecular e de baixa massa molecular (dalteparina, enoxaparina, tinzaparina). Já as heparinas de origem sintética são representadas pelos pentassacarídeos fondaparinux e idraparinax (CATERINE et al., 2007).

A atividade anticoagulante da heparina é definida com indireta, pois seu mecanismo antitrombótico ocorre por meio do aumento da atividade da antitrombina, um anticoagulante endógeno, responsável por inibir as proteases e fatores de coagulação tais como fator FIXa, FIIa, FXI, trombina e FXa (COSMI, PALARETI, 2012).

A administração das heparinas é realizada por meio de bomba de infusão. A dose inicial intravenosa contínua é de 80 a 100 unidades/kg. A enoxaparina pode ser administrada por via subcutânea para fins profiláticos assim como o fondaparinux. O principal efeito adverso, como o de qualquer outro anticoagulante, é a hemorragia e, por essa razão, o acompanhamento laboratorial do paciente é importante. Podem ocorrer também casos de trombocitopenia induzida por heparina, reações alérgicas, nas heparinas de origem animal, e alopecia reversível (ZEHNDER, 2007).



**Figura 17.** Estrutura da heparina (CHAVES et al., 2010).

### 1.5.2.2 Agentes fibrinolíticos

Há mais de 25 anos, os agentes fibrinolíticos são recomendados na terapia de reperfusão arterial em pacientes com infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (SBC, 2004; CALABRÒ et al., 2012).

A terapia fibrinolítica é voltada para a lise da malha de fibrina que envolve o trombo já estabelecido. Normalmente, alguns trombos recém-formados são removidos pelo sistema fibrinolítico do organismo, sem causar danos à parede arterial. O principal mediador dessa remoção é a plasmina, originária do plasminogênio sérico, uma pró-enzima que é ativada por proteases conhecidas como ativadoras de plasminogênio. Os agentes trombolíticos, como também são chamados, atuam como as enzimas ativadoras de plasminogênio, através da formação de um complexo com a pró-enzima inativa, favorecendo a formação de plasmina e a consequente lise do trombo. Os fármacos trombolíticos disponíveis na terapêutica são: (1) primeira geração: estreptoquinase e uroquinase; (2) segunda geração: alteplase, e (3) terceira geração: reteplase e tenecteplase (LU, LEMKE, 2008).

A reação adversa mais comum é a hemorragia e ocorre, na maioria dos casos, devido à baixa especificidade dos agentes trombolíticos à fibrina. Os fármacos são administrados via intravenosa e a dose é variável. É importante ressaltar que para fins de reperfusão arterial após infarto agudo do miocárdio, os benefícios são maiores naqueles tratados o mais precocemente possível (no máximo, até 3 horas após o início dos sintomas) (ROSITO, SILVA, FUCHS, 2000; SBC, 2004; LU, LEMKE, 2008).

### 1.5.2.3 Mecanismo da agregação plaquetária e fármacos que atuam na sua inibição

As plaquetas são fragmentos celulares anucleados que se originam do citoplasma dos megacariócitos, que quando inativas, possuem formato discóide (PALOMO et al., 2009). Sua função no organismo compreende

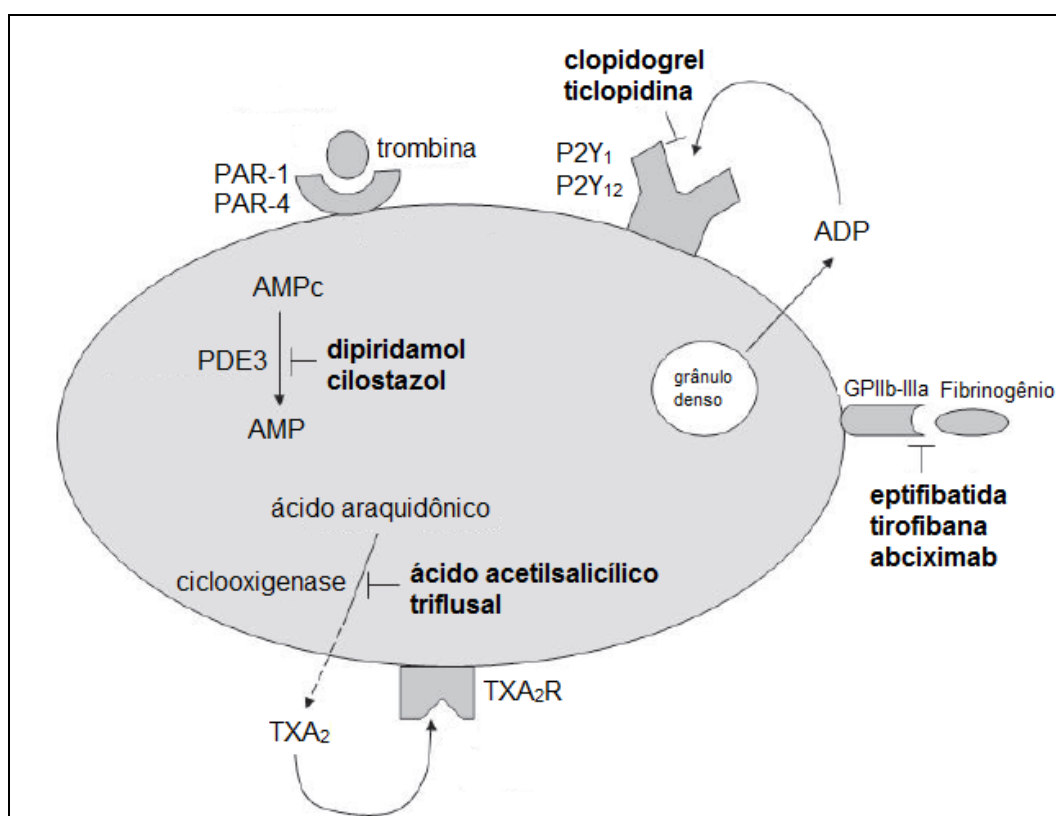


vários processos biológicos, desde o combate a agentes infecciosos até o início do reparo tecidual, em que possui papel relevante (FALCÃO et al., 2013). Sabe-se que os processos de adesão, ativação e agregação plaquetária sobre uma lesão endotelial ou placa de atheroma contribuem de forma significativa para a formação de trombos nas artérias coronárias, podendo obstruir total ou parcialmente estes vasos, levando a eventos isquêmicos agudos (OLIVEIRA et al., 2010).

Quando há uma lesão no endotélio, as plaquetas aderem à matriz extracelular com a finalidade de promover a reparação tecidual. Esta adesão plaquetária é mediada por proteínas subendoteliais, como colágeno e, principalmente, o fator de von Willebrand. Após esse processo, múltiplas vias metabólicas são ativadas e levam ao aumento na concentração intracelular de íons cálcio que, por sua vez, levam à formação de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e à ativação das plaquetas. As plaquetas ativadas liberam o conteúdo dos seus grânulos, que são compostos por: difosfato de adenosina (ADP), adenosina trifosfato (ATP), serotonina, cálcio, fibrinogênio, fator de von Willebrand; citocinas e fatores pró-trombóticos, que proporcionam o aumento da reatividade e da agregação das plaquetas. O receptor de glicoproteína IIb/IIIa, que também é o principal receptor de adesão, possui papel fundamental na agregação plaquetária, bem como o fibrinogênio, responsável por estabilizar o trombo e servir como ponte entre as plaquetas (OLIVEIRA et al., 2010; FALCÃO et al., 2013).

Diversas enzimas presentes no interior das plaquetas estão envolvidas no controle da sua reatividade e agregação como, por exemplo, a ciclooxigenase 1 (COX 1) e a fosfodiesterase III (PDE3). A primeira tem como principal função a síntese de TXA<sub>2</sub>, um potente agonista da agregação plaquetária. Já a PDE3, está relacionada com a conversão de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) em adenosina monofosfato (AMP). Esta última aumenta a concentração de cálcio intracelular e favorece a agregação plaquetária. Além de enzimas, receptores não glicoproteicos de ADP na superfície das plaquetas, como os receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>12</sub>, também proporcionam o aumento da reatividade e agregação plaquetária (PALOMO et al., 2009).

A Figura 18 mostra representação esquemática de uma plaqueta e os possíveis alvos de ação de fármacos antiplaquetários. Os fármacos disponíveis para essa finalidade podem atuar como inibidores enzimáticos (inibidores da COX-1 ou da PDE3), como antagonistas de receptores glicoproteicos (receptor IIb/IIIa) ou antagonistas de receptores não glicoproteicos (receptor de ADP). Os mecanismos de ação desses fármacos serão discutidos na sequência.



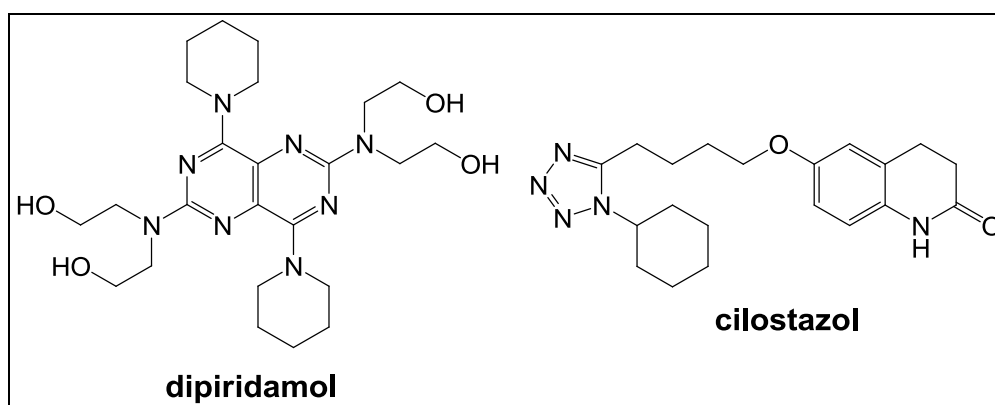
**Figura 18.** Representação esquemática de uma plaqueta e o alvo de ação dos fármacos inibidores da agregação plaquetária (adaptado de PALOMO et al., 2009).

➤ Inibidores da fosfodiesterase III (PDE3)

Os fármacos dessa classe agem como inibidores seletivos da PDE3 no interior das plaquetas, aumentando a concentração de AMPc intracelular. Por sua vez, o AMPc em concentrações elevadas inibe a liberação do cálcio intracelular, favorecendo a vasodilatação e inibindo a agregação plaquetária (SILVA et al., 2013). Em adição, esses fármacos bloqueiam a recaptção de adenosina, estimulando sua ação nos

receptores de adenosina ( $A_1$  e  $A_2$ ), aumentando os níveis de AMPc e inibindo a agregação plaquetária (LU, LEMKE, 2008).

A classe é representada por dois fármacos: o dipiridamol e o cilostazol (Figura 19). O dipiridamol é uma pirimidopirimidina com atividade inibitória na PDE3 e na recaptção de adenosina. É pouco utilizado como monoterapia e normalmente é administrado em associação com o ácido acetilsalicílico, formulação comercialmente disponível para a prevenção secundária de AVC (YOUSOUF, BHATT, 2011). Já o cilostazol é um derivado quinolínico, com potente atividade antiplaquetária por via oral. Seu uso é aprovado para casos de claudicação intermitente e, assim como o dipiridamol, a associação com ácido acetilsalicílico é vantajosa na prevenção secundária de AVC (ZEHNDER, 2007; LU, LEMKE, 2008; YOUSOUF, BHATT, 2011). Os efeitos adversos desses fármacos são raros e incluem cefaleia, palpitações e diarreia (PALOMO et al., 2009).



**Figura 19.** Estruturas do dipiridamol e do cilostazol.

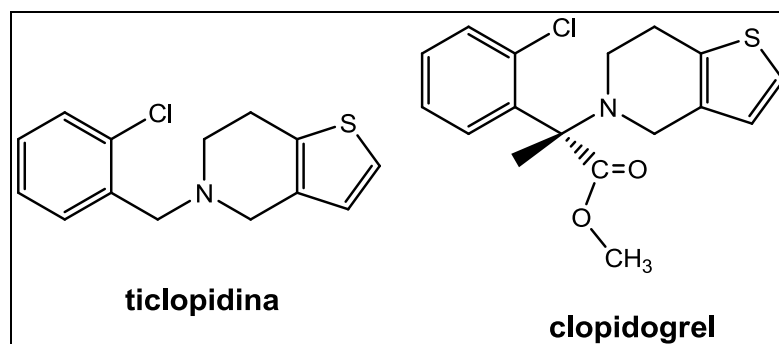
➤ Inibidores do receptor purinérgico P2Y

O difosfato de adenosina (ADP) exerce papel relevante na formação do trombo por promover a ativação e agregação plaquetária. O alvo molecular da ADP nas plaquetas são os receptores purinérgicos P2Y acoplados à proteína G, mais especificamente, o P2Y<sub>1</sub> e o P2Y<sub>12</sub>. Inicialmente, a ADP liga-se à P2Y<sub>1</sub> iniciando a agregação plaquetária. Posteriormente, a ligação da ADP ao receptor P2Y<sub>12</sub> leva à agregação plaquetária acentuada pela inibição da adenilato ciclase e redução dos

níveis de AMPc (LU, LEMKE, 2008; BUCH, PRENDERGAST, STOREY, 2010).

Os fármacos dessa classe agem por inibição irreversível e seletiva do receptor purinérgico P2Y<sub>12</sub>, impedindo a ligação da ADP e, conseqüentemente, a agregação plaquetária sustentada. O clopidogrel e a ticlopidina (Figura 20), derivados da tienopiridina, representam esses inibidores e são extensamente prescritos para a prevenção de infarto agudo do miocárdio, doença arterial periférica e AVC. Entretanto, a ticlopidina apresenta alguns efeitos adversos graves como neutropenia e a púrpura trombocitopênica trombótica, o que fez com que essa fosse substituída nos últimos anos pelo clopidogrel, fármaco bem tolerado e com baixo índice de efeitos adversos, que podem incluir diarreia, náuseas, vômitos e erupções cutâneas (BUCH, PRENDERGAST, STOREY, 2010; YOUSUF, BHATT, 2011).

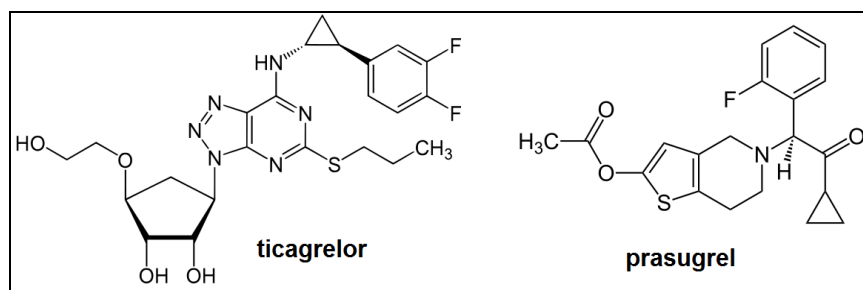
Tanto a ticlopidina quanto o clopidogrel são pró-fármacos e necessitam do metabolismo hepático para terem atividade. As doses recomendadas são de 250 mg duas vezes ao dia para a ticlopidina e 300 mg como dose de ataque e 75 mg/dia como dose de manutenção para o clopidogrel (ZEHNDER, 2007; BUCH, PRENDERGAST, STOREY, 2010).



**Figura 20.** Estrutura da ticlopidina e do clopidogrel.

Recentemente, novos inibidores da P2Y foram aprovados para uso clínico, sendo eles: prasugrel e ticagrelor (Figura 21). O prasugrel é um inibidor irreversível derivado da tienopiridina. A diferença entre o clopidogrel e o prasugrel é potência, sendo que este último possui atividade antiplaquetária mais robusta. O prasugrel também é um pró-fármaco, porém necessita de menos etapas em relação ao clopidogrel

para ter atividade. Já o ticagrelor é um derivado da ciclo-pentil-triazol-pirimidina, que inibe, reversivelmente, a  $P2Y_{12}$ , sem necessitar de ativação hepática pelo CYP450 (citocromo P450) (YOUSUF, BHATT, 2011).

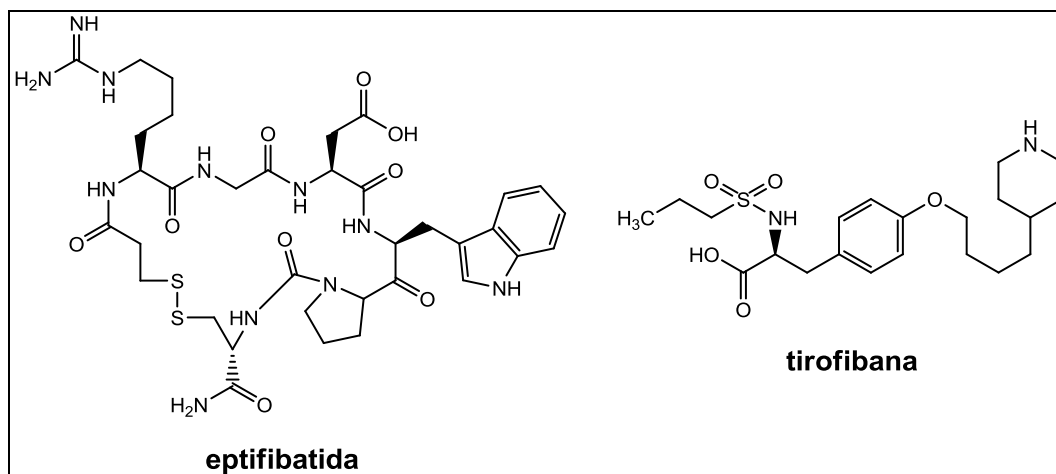


**Figura 21.** Estruturas do ticagrelor e do prasugrel.

➤ **Antagonistas dos receptores de glicoproteína IIb/IIIa**

Os receptores de glicoproteínas IIb/IIIa estão presentes em abundância na superfície das plaquetas e correspondem ao principal receptor de fibrinogênio, constituindo a via final e mais importante da agregação plaquetária (BUCH, PRENDERGAST, STOREY, 2010; YOUSUF, BHATT, 2011). A molécula de fibrinogênio utiliza esse complexo glicoproteico para realizar ligações cruzadas com as plaquetas, favorecendo a agregação plaquetária. Dessa maneira, a inibição desses receptores é um alvo relevante para prevenção de eventos cardiovasculares trombóticos.

Os compostos que atuam como antagonistas dos receptores de glicoproteína IIb/IIIa incluem o anticorpo monoclonal abciximabe, primeiro fármaco da classe aprovado para ser utilizado em síndromes coronárias agudas, além da eptifibatida (peptídeo) e a tirofibana (não-peptídico) (Figura 22) (GOMES et al., 2000; ZEHNDER, 2007). Todos são administrados por via parenteral, com indicação para o tratamento de angina instável e infarto agudo do miocárdio. Os principais efeitos adversos são a hemorragia e a trombocitopenia. Entretanto, com o advento das tienopiridinas (clopidogrel), esses fármacos estão entrando em desuso (ZEHNDER, 2007; LU, LEMKE, 2008; YOUSUF, BHATT, 2011).

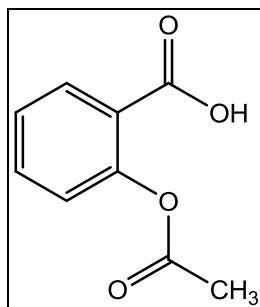


**Figura 22.** Estruturas da eptifibatida e da tirofibana (adaptado de LU; LEMKE, 2008).

➤ Inibidores da ciclooxygenase 1 (COX-1)

A enzima ciclooxygenase possui duas isoformas no organismo: ciclooxygenase-1 (COX-1) e clicooxygenase-2 (COX-2). A COX-1 está presente em todos os tecidos inclusive nas plaquetas, nas quais sua função principal é sintetizar tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). O TXA<sub>2</sub> é uma prostaglandina que induz a agregação plaquetária, vasoconstrição e proliferação do músculo liso, sendo importante mediador de eventos vaso-oclusivos agudos, tais como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (ARAB et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005). Dessa maneira, os fármacos que antagonizam essa via interferem na agregação plaquetária, podendo reduzir o risco de isquemia tecidual.

O ácido acetilsalicílico (AAS) (Figura 23) é o protótipo dos fármacos inibidores das ciclooxygenases. O AAS pertence à classe dos antiinflamatórios não-esteroides e sua descoberta representou importante quebra de paradigmas no que se diz respeito ao desenvolvimento de fármacos, que até então era limitada à descoberta ao acaso, pois este é um dos primeiros fármacos da história obtido por síntese (VIEGAS Jr, BOLZANI, BARREIRO, 2006; LU, LEMKE, 2008).



**Figura 23.** Estrutura do ácido acetilsalicílico (AAS).

Atualmente, o AAS é o antiplaquetário mais comumente empregado na prevenção de eventos cardiovasculares decorrentes da aterosclerose (SILVA et al., 2013). O seu uso como estratégia na prevenção primária e secundária em pacientes com enfermidades cardiovasculares estabelecidas merece destaque pela ampla aceitação, além de ser comprovado por diversos estudos clínicos (YOUSUF, BHATT, 2011). O AAS é capaz de reduzir em 34% a prevalência de infarto do miocárdio, em 25% os acidentes vasculares cerebrais, em 67% o tromboembolismo pulmonar e em 23% a trombose venosa profunda (GABRIEL et al., 2006; GARCÍA, LÓPEZ-JARAMILLO, 2008).

O mecanismo de ação do AAS é inibir a síntese de prostaglandinas mediante a inativação da ciclooxigenase (COX), através da acetilação covalente, irreversível e não seletiva das isoenzimas COX-1 e COX-2 (MONTEIRO et al., 2008). Ao inibir a COX-1, como consequência, ocorre inibição da síntese de TXA<sub>2</sub> pelas plaquetas, reduzindo a agregação plaquetária (YOUSUF, BHATT, 2011). Essa inibição permanece até o final do ciclo de vida das plaquetas (7 a 10 dias) (LU, LEMKE, 2008).

A dose indicada para prevenção de DCVs ainda é assunto de debate entre muitos especialistas (YOUSUF, BHATT, 2011). Entretanto, a Sociedade Brasileira de Cardiologia recomenda a administração de 200 mg/dia, encontrada na formulação existente no País (SBC, 2004).

Seus principais efeitos adversos consistem em intolerância por desconforto gástrico, úlceras gástricas e duodenais. Com menos frequência ocorrem hepatotoxicidade, asma, exantemas e toxicidade

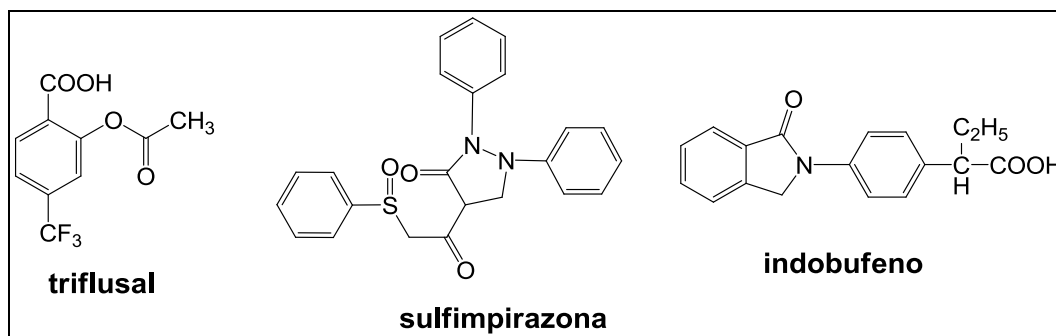
renal. Além disso, a ação antiplaquetária do AAS contraindica seu uso em pacientes com hemofilia (FURST, ULRICH, 2007; MONTEIRO, 2008).

Recentemente, a literatura relata casos de resistência ao AAS, identificados quando este não exerce seus efeitos cardioprotetores em pacientes com complicações trombóticas. Esses casos de resistência têm gerado polêmica e preocupado especialistas da área. Entretanto, essa situação foi observada em menos de 1% dos pacientes, por meio da avaliação bioquímica da atividade direta do AAS na enzima COX-1. O mecanismo pelo qual essa resistência aparece não é bem estabelecido. Uma das hipóteses está relacionada ao uso concomitante com outros antiinflamatórios não-esteroides, que inibem a COX-1 e competem com o AAS pelo sítio catalítico da enzima. O problema é que enquanto a inibição dos AAS é irreversível e prolongada durante todo o ciclo de vida da plaqueta, a inibição da COX-1 pelos demais antiinflamatórios não esteroides é reversível a consequência é que o efeito na inibição da agregação plaquetária é reduzido. Outros fatores como o tabagismo, fatores genéticos, mutações na enzima COX-1 também podem estar associados a essa resistência (LU, LEMKE, 2008; YOUSUF, BHATT, 2011).

Outros fármacos da classe dos inibidores da COX-1 são o triflusal, sulfimpirazona e o indobufeno (Figura 24). O triflusal tem estrutura química semelhante ao AAS e o mesmo mecanismo de ação, porém suas propriedades farmacocinéticas são diferentes. O metabólito do triflusal, o ácido benzoico 2-hidroxi-4-(trifluormetil) ou HTB, também é capaz de inibir a COX-1, enquanto que o metabólito do AAS, o ácido salicílico, não tem efeito significativo sobre as plaquetas. Em contrapartida, não existem vantagens terapêuticas do triflusal na prevenção de DCVs em relação ao AAS. Porém, costuma-se associar o uso do triflusal com o menor índice de efeitos adversos (KASKI, FERNANDÉZ, GUÍU, 2008; LU, LEMKE, 2008).

A sulfimprazona, derivado da fenilbutazona, é um inibidor reversível e, portanto, de curta duração (4 a 6 horas) da COX. O indobufeno também é um inibidor reversível, porém potente, da COX-1 e que mostrou eficácia semelhante ao AAS. Entretanto, o uso desses fármacos é restrito a poucos países (LU, LEMKE, 2008).





**Figura 24.** Estruturas do triflusal, sulfimpirazona e indobufeno.

#### 1.5.2.4 Associação entre estatinas e ácido acetilsalicílico para prevenção de doenças cardiovasculares

A partir do conhecimento da fisiopatologia da doença e do mecanismo de ação das estatinas e do AAS, pode-se sugerir que a combinação desses fármacos representa uma escolha lógica na redução do risco cardiovascular em pacientes com doença arterial coronariana estabelecida. O raciocínio é simples: enquanto as estatinas impedem a formação de novas placas de ateroma por redução do colesterol plasmático e, também, estabilizam as placas já formadas, o AAS impede que as placas instáveis já instaladas no vaso sanguíneo provoquem trombos na corrente circulatória (CHAPMANN, 2007).

Estudos clínicos já demonstraram que a associação entre estatinas e AAS é vantajosa para a redução dos riscos de infarto agudo do miocárdio fatal e não fatal e AVC, em comparação com a utilização desses fármacos isolados (CHAPMANN, 2007). Por exemplo, em estudo realizado por Hennekens e colaboradores (2004) com 73.900 pacientes, a coadministração de pravastatina e AAS representou redução no risco de infarto agudo do miocárdio fatal e não fatal de 31% e redução de 29% no risco de AVC em comparação ao ácido acetilsalicílico como monoterapia. Quando comparado à administração isolada de pravastatina, esses valores foram de 26% para infarto agudo do miocárdio fatal e não fatal e 31% para o AVC. Esse mesmo estudo sugeriu que a atividade da estatina pode ser sinérgica ao AAS, devido às propriedades antiinflamatórias desses fármacos.

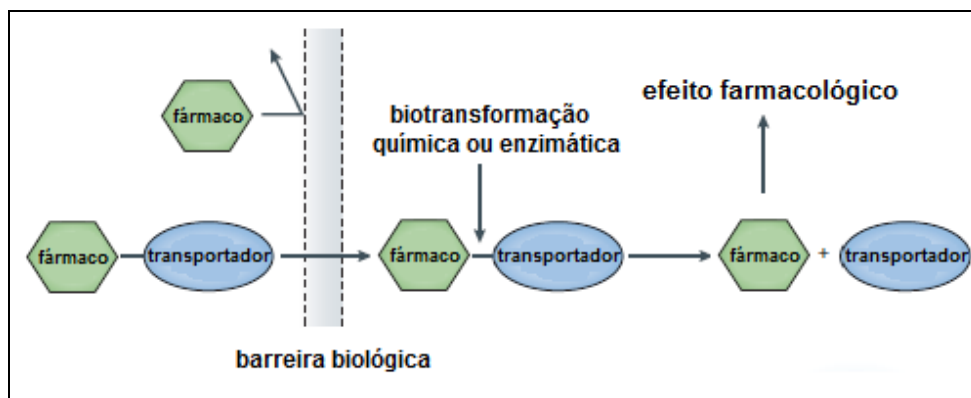
Dessa maneira, a combinação desses fármacos pode representar uma importante alternativa terapêutica na prevenção de mortes prematuras por DCVs (CHAPMANN, 2007).

## 1.6 PLANEJAMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Entre os métodos de introdução de novos fármacos na terapêutica, os processos de modificação molecular são os mais promissores (WERMUTH, 2008). Pode-se dizer que a modificação molecular é um processo promissor, tendo-se em vista a capacidade de reduzir propriedades indesejáveis e ressaltar as desejáveis, mediante retirada, substituição ou introdução de grupos químicos, cuja participação na atividade biológica é determinante, ou cuja função acessória pode auxiliar na interação com o receptor. Buscam-se, através desse processo, a obtenção de fármacos mais potentes, com menos efeitos adversos, maior especificidade, ou com melhores propriedades farmacocinéticas e organolépticas. Entre os processos de modificação molecular, merece destaque a latenciação.

## 1.7 LATENCIAÇÃO

A latenciação consiste, pela definição clássica, na ligação do fármaco com um transportador, por meio de ligação biorreversível, tornando o composto inativo ou parcialmente inativo. Este, *in vivo*, mediante reação química ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele (Figura 25). Através desse processo são obtidos os pró-fármacos, uma das classes de fármacos latentes obtidas por esse processo de modificação molecular (CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005; WERMUTH, 2008).



**Figura 25.** Representação esquemática do conceito de pró-fármaco clássico (adaptado de RAUTIO et al., 2008).

O objetivo no desenvolvimento de pró-fármacos, de maneira geral, está voltado para melhorar diversas propriedades indesejáveis do fármaco protótipo sem alterar, no entanto, a atividade biológica do fármaco. Esse processo permite reduzir problemas relacionados à fase farmacocinética e farmacêutica dos fármacos e, indiretamente, à fase farmacodinâmica, problemas esses que limitam sua utilização clínica.

Segundo Wermuth (1984), as formas latentes podem ser classificadas em pró-fármacos, subdivididos em pró-fármacos clássicos, bioprecursores, pró-fármacos mistos e recíprocos, e fármacos dirigidos, dependendo dessa classificação do emprego e do tipo de grupo transportador.

Os pró-fármacos clássicos são aqueles definidos anteriormente. Compreendem a ligação do fármaco a um transportador adequado e objetivam aprimoramento das propriedades farmacocinéticas com consequente melhora da atividade terapêutica. Outras vantagens são o aumento da biodisponibilidade, seletividade, prolongamento de ação e redução da toxicidade (CHUNG et al., 2005).

Os bioprecursores correspondem a fármacos latentes na ausência de transportador. São estruturas que necessitam do metabolismo, geralmente pelo sistema redox celular, para se tornarem ativas, ou seja, o metabólito é quem exerce a atividade biológica (CHUNG, FERREIRA, 1999; CHUNG et al., 2005; RAUTIO et al., 2008). Exemplo de bioprecursores é a lovastatina. Esse inibidor da HMG-CoA redutase possui uma lactona na sua estrutura, que precisa ser hidrolisada para liberar sua

porção responsável pela atividade biológica (SILVA et al., 2005; CHUNG et al., 2005).

Já os pró-fármacos recíprocos são formas latentes em que o transportador e o fármaco apresentam atividade biológica. A associação de dois compostos ativos em uma mesma molécula permite o sinergismo de ação entre os fármacos que podem atuar por mecanismos únicos ou diferentes entre si (CHUNG, FERREIRA, 1999; SILVA et al., 2005; CHUNG et al., 2005).

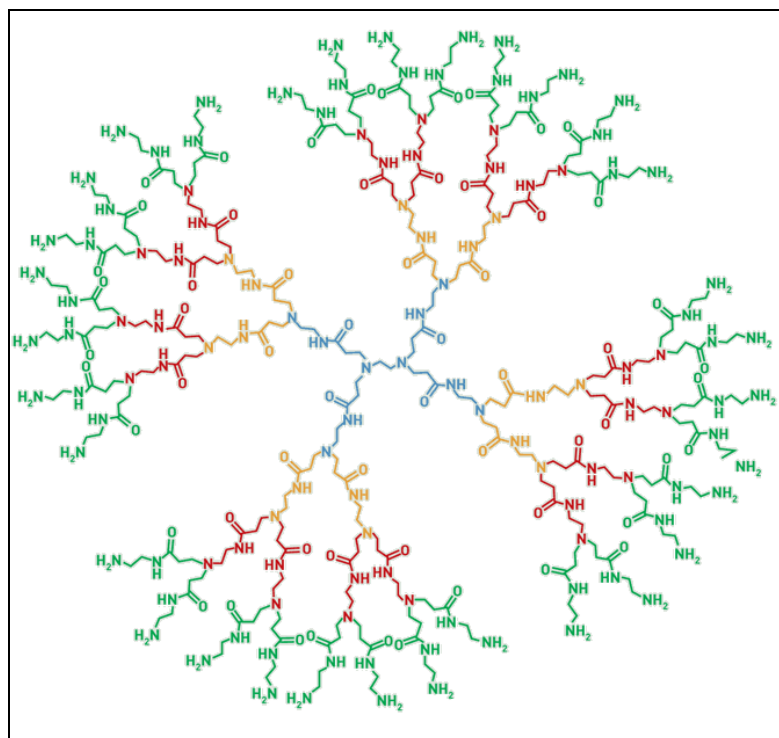
Quando a estrutura latente possui características de pró-fármaco clássico e de bioprecursor, se apresentando como uma molécula inativa, que necessita de diversas etapas metabólicas para a liberação da forma ativa, esta recebe o nome de pró-fármaco misto. Nesse caso, o transportador necessita ser metabolizado na sua forma ativa para poder liberar o fármaco no local de ação (CHUNG et al., 2005).

Os fármacos dirigidos são planejados para serem seletivos para determinados alvos biológicos através da ligação reversível do fármaco a grupos transportadores específicos. Esse tipo de forma latente necessita de conhecimento prévio sobre as características do alvo e sua relação com o transportador. O objetivo principal dessa modificação molecular é reduzir os efeitos adversos por ação inespecífica do fármaco em outros alvos (CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005; HAN, AMIDON, 2000).

## 1.8 DENDRÍMEROS

A origem do termo dendrímero vem do grego, em que “dendron” significa árvore e “meros”, significa parte. Nesse contexto, os dendrímeros representam nova classe de polímeros, que se assemelham aos ramos de uma árvore, devido a sua estrutura repetitiva e com elevado número de ramificações (TOMALIA et al., 1985; CAMINADE, 2011). A primeira estrutura seguindo esse conceito foi apresentada para a comunidade científica em 1978, por Vögtle e colaboradores, com o nome de moléculas “em cascata”. Em 1985, materiais análogos foram descritos Newkome, com o nome de arborols (derivado do latim “arbor”, que significa árvore) e

por Tomalia, que as definiu como dendrímeros (MOOREFIELD, PERERA, NEWKOME, 2012). Desde então, diversas estruturas dendriméricas foram propostas. A mais conhecida e utilizada mundialmente é o dendrímero de poliamidoamina (PAMAM), sintetizado por Tomalia e colaboradores, em 1984 (Figura 26) (CAMINADE, 2011; MOOREFIELD, PERERA, NEWKOME, 2012).



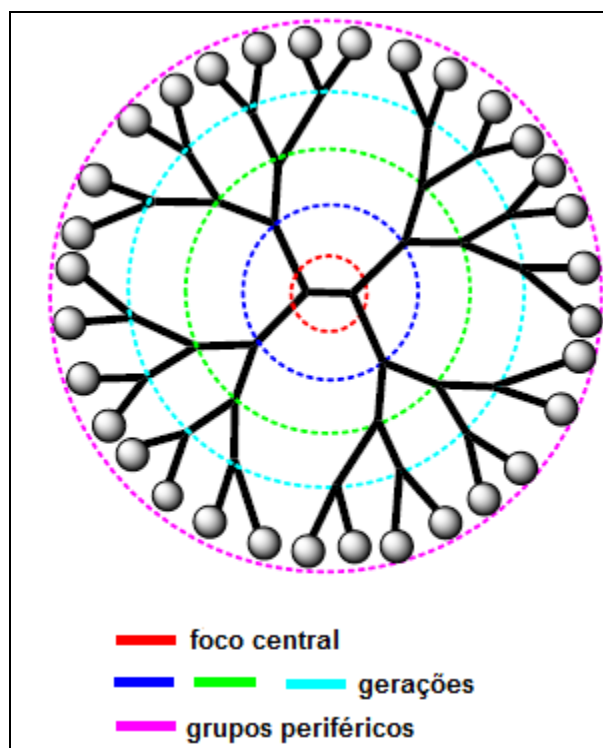
**Figura 26.** Dendrímero de PAMAM de 3ª geração (HALFORD, 2005).

Os dendrímeros são estruturas que diferem dos polímeros lineares tradicionais, pois além de possuírem formato globular, são simétricos, com baixo grau de polidispersão e possuem grande número de grupos funcionais periféricos (NANJWADE et al., 2009; SZYMANSKI, MARCOWICZ, OLASIK, 2011). São considerados exemplos de nanotecnologia e seu tamanho pode variar entre 10 a 30 Å (PILLAI, PANCHAGNULA, 2001).

A estrutura básica de um dendrímero é definida na presença de três componentes principais: um foco central multifuncional; camadas de ramificações repetidas, conhecidas como monômeros ou *dendrons*, que partem desse foco central, e grupos de superfície funcionalizados (Figura 27) (AULENTA, HAYNES, RANNARD, 2003). O foco central do dendrímero é denominado geração zero e a cada camada de *dendrons*

adicionada determina-se uma nova geração. Essa subsequente adição de gerações multiplica de forma linear o diâmetro do dendrímero e de forma exponencial o número de grupos funcionais da estrutura (NANJWADE et al., 2009; BHATTACHARYA et al., 2013).

No geral, os dendrímeros de geração baixa possuem uma estrutura aberta e, à medida que as gerações aumentam, o dendrímero adquire sua forma característica globular (D'EMANUELE, ATTWOOD, 2005). Vale ressaltar que essa adição de gerações é finita e limita-se ao impedimento estérico entre as ramificações (GRAYSON, FRÉCHET, 2001; McCARTHY et al., 2005).

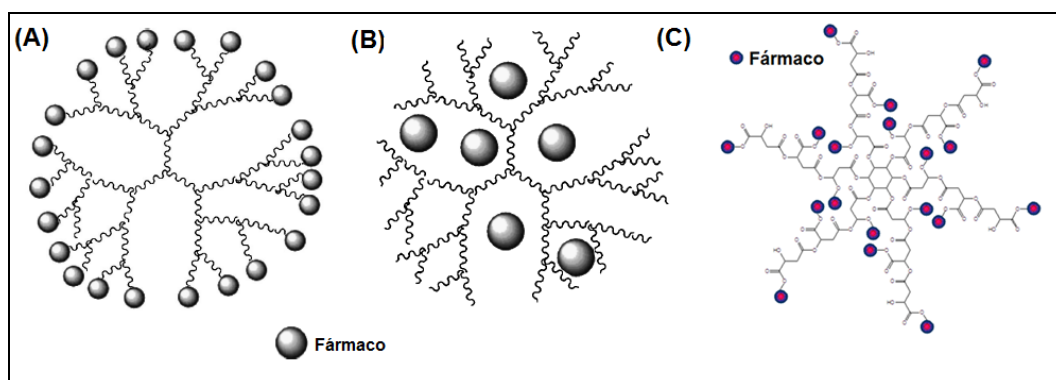


**Figura 27.** Representação esquemática de um dendrímero de terceira geração. O foco central (geração zero) está representado em vermelho. As gerações estão representadas em azul (primeira geração), verde (segunda geração) e ciano (terceira geração). A superfície funcionalizada está representada em roxo (adaptado de TWIBANIRE, GRINDLEY, 2012).

As características estruturais dessas moléculas as tornam interessantes para inúmeras aplicações no campo biomédico, com destaque para o transporte de fármacos (SVENSON, 2009). De acordo com Szymanski e colaboradores (2011), os dendrímeros podem prolongar o tempo de ação de fármacos, aumentar a estabilidade e proteger contra degradação no meio biológico. Além disso, os grupos funcionais

periféricos permitem que o fármaco seja direcionado a um tecido específico. Entretanto, para atuarem como transportadores, os dendrímeros devem possuir algumas características, como baixa imunogenicidade, baixa toxicidade, perfis de retenção, distribuição e biodisponibilidade adequados para atravessar barreiras biológicas e não serem eliminados da corrente circulatória antes da atividade farmacológica (BOAS, HEEGARD, 2004; SZYMANSKI, MARKOWICZ, MIKIUCIUK-OLASIK, 2011).

Os dendrímeros podem ser utilizados como transportadores de fármacos por dois métodos principais: (1) incorporação do composto bioativo nas cavidades internas da malha dendrímica e (2) ligação covalente do fármaco na superfície dendrítica funcionalizada (NAJLAH et al., 2006). No presente trabalho, propõe-se nova metodologia de transporte de fármacos por dendrímeros, na qual os *dendrons* são os fármacos/compostos bioativos ligados a um espaçante (ácido L(-)-málico) e as gerações crescem à medida que camadas repetidas de fármaco e espaçante são adicionadas, proporcionando aumento exponencial do composto ativo a cada geração. Esse novo método mereceu pedido de patente por Ferreira e Giarolla (2008) e está em análise no INPI (Figura 28).



**Figura 28.** Representação esquemática de transporte de fármacos por dendrímero. (A) Ligação do fármaco a superfície covalente do dendrímero; (B) Incorporação do fármaco na malha dendrímica e (C) Dendrímero de terceira geração, em que os fármacos compõem os *dendrons* (FERREIRA; GIAROLLA, 2008; LIN, JIANG, TONG, 2010).

### 1.8.1 Síntese dos dendrímeros

A síntese de dendrímeros vem sendo estudada desde 1979 (NANJWADE, 2009). De modo geral, os dendrímeros são sintetizados por etapas repetitivas, que permitem o controle do tamanho final da estrutura. O número de etapas empregadas na síntese varia de acordo com a geração que se deseja (INOUE, 2000; TORASKAR, PANDE, KADAM, 2011).

Dois métodos tradicionais e bem fundamentados pela literatura são utilizados na obtenção das estruturas dendriméricas. O primeiro leva o nome de síntese divergente e foi desenvolvido pelos grupos de pesquisa de Tomalia e Newkome. O segundo, desenvolvido por Hawker e Frechét, recebe o nome de síntese convergente. A diferença básica entre os métodos está na direção de crescimento da estrutura dendrítica. Enquanto a abordagem divergente permite um crescimento radial “de dentro para fora”, a abordagem convergente faz o contrário, permitindo o crescimento do dendrímero de “fora para dentro” (LIU, FRÉCHET, 1999).

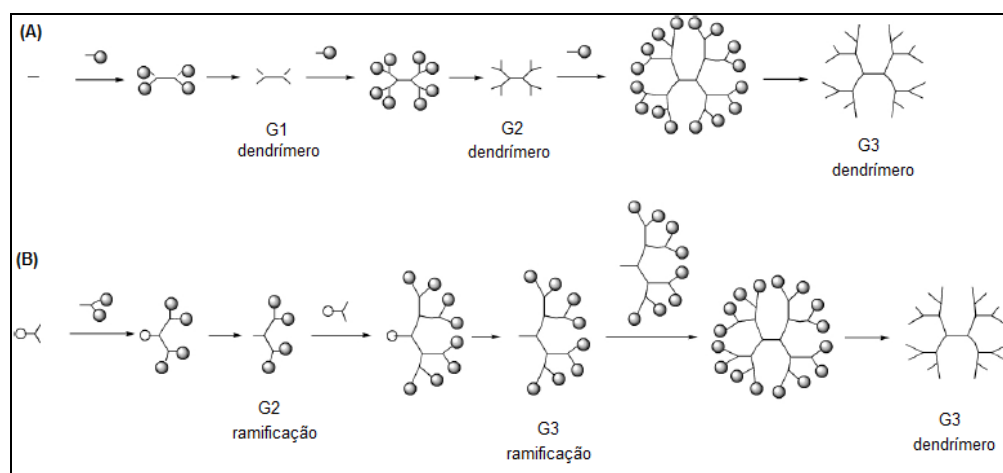
O método divergente utiliza um foco central multifuncional como molécula inicial da síntese. A partir desse foco central, adicionam-se, repetitivamente, os dendrons, até que toda a superfície multifuncional do foco central esteja ocupada. Este foco central ligado à primeira camada de monômeros é classificado como dendrímero de primeira geração. Por sua vez, os monômeros adicionados ao foco central possuem superfície funcionalizada, que permite o crescimento da malha dendrimérica pela adição de novos monômeros. A adição de novos dendrons ao dendrímero de primeira geração classifica a estrutura como sendo de segunda geração. Esse processo pode ser repetido até que se alcance o número de gerações desejadas ou até que o impedimento estérico entre as ramificações limite a adição de novos monômeros (Figura 29) (BABU et al., 2010).

A principal desvantagem da abordagem divergente são as reações incompletas nos grupos terminais. Essas reações geram falhas e imperfeições na estrutura levando à obtenção de dendrímeros com diferentes massas moleculares. Apesar disso, esse método de síntese é o preferido na maioria das indústrias que produzem dendrímeros comerciais



como a Dendrimax (EUA), DSM Fine Chemicals (Holanda) e Perstop Group (Suécia), além de ser a rota utilizada na síntese de dendrímeros de PAMAM (ESFAND, TOMALIA, 2001; JESUS, 2003).

A abordagem convergente surgiu com o objetivo de solucionar os problemas de reação incompleta e falha nas estruturas dendriméricas obtidas pelo método divergente. Ao contrário do método anterior, a molécula inicial da síntese é o dendron. A partir do dendron, são adicionados novos monômeros como “blocos de construção”, até que se obtenha estrutura com o número de ramificações desejado. Posteriormente, essa estrutura ramificada é adicionada ao foco central multifuncional, formando o dendrímero (MEDINA, EL-SAYED, 2009). O método convergente leva à formação de dendrímeros monodispersos, de fácil purificação e com alto rendimento. Entretanto, não permite a obtenção de gerações mais elevadas como o método divergente, devido ao impedimento estérico entre as ramificações e o foco central (JESUS, 2003; NANJWADE et al., 2009).



**Figura 29.** Esquema de síntese de dendrímeros pelo método divergente (A) e convergente (B) (adaptado de BOAS, HEEGARD, 2004).

### 1.8.2 Aplicações dos dendrímeros

As características peculiares dos dendrímeros, como tamanho nanoscópico, superfície altamente funcionalizada, baixa polidispersão e processo de síntese bem controlado, permitem a essas novas arquiteturas moleculares elevada gama de aplicações, especialmente na

área biomédica (KLAJNERT, BRYSEWSKA, 2001). Entre as aplicações citadas na literatura podem-se destacar o transporte de fármacos, a terapia gênica e a imagiologia médica (SVENSON, 2009).

Cerca de 40% dos compostos bioativos desenvolvidos pelas indústrias farmacêuticas são rejeitados devido à baixa biodisponibilidade em decorrência da solubilidade limitada em água e/ou baixa permeabilidade pelas membranas biológicas. Em adição, 17% dos fármacos lançados na terapêutica exibem atividade biológica abaixo do esperado pelas mesmas razões. Dessa maneira, o emprego de transportadores de fármacos tornou-se alternativa viável e necessária, despertando grande interesse da indústria farmacêutica. Nesse contexto, os dendrímeros são excelentes candidatos ao transporte de fármacos, pois possuem a capacidade de atravessar barreiras biológicas com taxas satisfatórias (SVENSON, 2009).

Nos últimos anos, a estrutura dendrítica tem sido estudada com sucesso como transportador de fármacos nas vias transdérmica, oral, ocular e pulmonar (NANJWADE et al., 2009). Além de favorecer a passagem pelas membranas biológicas, os fármacos incorporados na malha dendrítica ou ligados covalentemente à sua superfície, podem apresentar melhora na solubilidade em água e meia-vida maior em relação ao fármaco livre. Além disso, os dendrímeros podem proporcionar a liberação controlada dos fármacos e, também, dirigi-los para o tecido alvo. Essas características permitem maior seletividade e biodisponibilidade e conduzem a maior eficácia terapêutica (LEE et al., 2005).

A incorporação de moléculas de cisplatina, fármaco antineoplásico, em dendrímeros de PAMAM, é um exemplo da aplicação dos dendrímeros no transporte de fármacos. A associação do fármaco na estrutura dendrítica melhorou a solubilidade em água da cisplatina, reduziu sua toxicidade e permitiu o acúmulo do fármaco na massa tumoral cinco vezes superior em relação ao fármaco livre, o que favoreceu a inibição do crescimento do tumor (LEE et al., 2005). Outro exemplo são os dendrímeros de PAMAM conjugados com fluoruracila, fármaco antineoplásico de elevada toxicidade. Esses dendrímeros apresentaram boa solubilidade e liberação controlada, com redução dos efeitos

adversos da fluoruracila (KLAJNERT, BRYSEWSKA, 2001). Além da atividade antineoplásica, dendrímeros com atividade antiviral e antibacteriana também são encontrados com frequência na literatura (BOAS, HEEGARD, 2003).

A aplicação dos dendrímeros na terapia gênica é focada principalmente na capacidade dessas macromoléculas em transportar DNA, RNA e plasmídeos para o interior das células atingindo seu núcleo (GONZALO, MUÑOZ-FERNÁNDEZ, 2009). O emprego de dendrímeros na transfecção de genes torna-se vantajoso em relação ao método clássico, que utiliza vírus como vetor, uma vez que essas novas arquiteturas moleculares possuem baixa imunogenicidade (NANJWADE et al., 2009). Nesse contexto, dendrímeros de PAMAM mostraram-se eficientes no transporte de material genético. Os ácidos nucleicos que compõem DNA possuem grupos fosfato, que interagem com o dendrímero de PAMAM através dos grupos amina presentes na sua superfície. Os dendrímeros podem transportar grande quantidade de material genético em relação aos lipossomas e aos vírus, além de serem mais estáveis. Essa atividade foi tão promissora que, dendrímeros de PAMAM ativados, denominados SuperFect™, são comercializados para fins de terapia gênica (KLAJNERT, BRYSEWSKA, 2001).

Os dendrímeros também possuem atividade promissora como transportadores de agentes de contraste utilizados em técnica de diagnóstico *in vivo* por ressonância magnética nuclear. Normalmente, utiliza-se sal de gadolínio como agente de contraste, entretanto, sua baixa massa molecular faz com que esse composto alcance zonas extravasculares, dificultando a visualização dos vasos sanguíneos, quando esta for necessária. Dessa maneira, diversos grupos desenvolveram complexos dendriméricos com íons de gadolínio. Os testes preliminares mostraram que a utilização desse complexo foi vantajosa, pois o complexo se comportava como um agente de contraste melhor em relação ao gadolínio livre, aprimorando a visualização das estruturas vasculares (KLAJNERT, BRYSEWSKA, 2001; JESUS, 2003).

## 1.9 MODELAGEM MOLECULAR

A aplicação da modelagem molecular está em ascensão, não só na área farmacêutica, mas, também, em outras áreas biológicas, na química e nas ciências dos materiais. Nos últimos anos, o desenvolvimento de recursos computacionais tanto de máquina (*hardware*) quanto de programas (*softwares*), em adição ao desenvolvimento de técnicas de química computacional, ressonância magnética nuclear, bioquímica e biologia molecular e cristalografia de raios-X, permitiram a expansão dessa importante área para a química farmacêutica (ANDRADE, TROSSINI, FERREIRA, 2010).

Segundo a IUPAC, a modelagem molecular é a investigação das estruturas e das suas propriedades moleculares utilizando a química computacional e técnicas de visualização gráfica, a fim de fornecer representação tridimensional do sistema em estudo, sob um dado conjunto de circunstâncias ou critérios definidos pelo investigador (SANT'ANNA, 2002). Como o próprio nome já diz, a modelagem molecular consiste na proposição de modelos, ou seja, hipóteses que podem ou não se aproximar da realidade (SANTOS, 2001).

A aplicação da modelagem molecular na área farmacêutica, mais especificamente no planejamento de fármacos, é voltada para a descoberta de novos ligantes, otimização de protótipos já existentes e para o planejamento racional de candidatos a fármacos (ANDRADE, TROSSINI, FERREIRA, 2010). Essa abordagem computacional (ou *in silico*), que visa auxiliar o planejamento de novos fármacos, é denominada no campo da química medicinal como *Computer Assisted Drug Design* (CADD). O CADD compreende diversos métodos que objetivam, por exemplo, determinar distâncias interatômicas; definir densidade eletrônica de moléculas; estudar o perfil de equilíbrio conformacional como meio de definir a conformação bioativa do ligante; explorar racionalmente as atividades biológicas das substâncias, bem como seu mecanismo de ação ao nível eletrônico e/ou molecular, além de identificar interações específicas entre o fármaco e o receptor para a determinação de grupos farmacofóricos (BARREIRO, RODRIGUES, 1997). Tratando-se de CADD,

duas abordagens são clássicas na construção de modelos: a abordagem dependente do receptor ou *Structure-based drug* (SBDD) e a abordagem indireta ou *Ligand-based drug design* (LBDD) (SANT'ANNA, 2002).

A abordagem direta considera de maneira explícita as interações entre o fármaco e a estrutura de um receptor obtido por dados cristalográficos ou por homologia de proteínas, por exemplo. Já a abordagem indireta considera a correlação entre a atividade biológica dos ligantes com a sua própria estrutura química, ou variável associada a essas estruturas, de modo que se torna possível propor o sítio ativo para um receptor hipotético, denominado modelo farmacofórico. Esta última compreende estudos de relação quantitativa entre estrutura química e atividade biológica (QSAR) e é amplamente utilizada no planejamento de novos fármacos (BARREIRO, RODRIGUES, 1997; SANT'ANNA, 2009).

Para calcular as propriedades de moléculas, a modelagem molecular utiliza-se de programas computacionais ou algoritmos (PATRICK, 2008). Entretanto, as moléculas de partida não necessariamente estão na sua conformação mais estável e seus ângulos de ligações e ângulos diédricos podem estar distorcidos. Para corrigir essas distorções, as moléculas devem ser otimizadas pelo processo de minimização de energia. Duas abordagens matemáticas são utilizadas como base nesse processo: (1) métodos de mecânica molecular; (2) métodos de mecânica quântica (CARVALHO et al., 2003).

Os métodos de mecânica molecular consideram as moléculas como um conjunto de átomos conectados e não incluem elétrons em seus cálculos. Essa conexão entre os átomos pode ser representada por mola com constantes de força características. O campo de força neste caso é constituído pela somatória de energias, como distância de ligação, ângulos de ligação, ângulos diédricos, distâncias de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Esta somatória está relacionada com as posições de equilíbrio do sistema e podem ser associadas como penalidades energéticas para seu afastamento, isto é, as constantes de força das “molas” que ligam os átomos (BARREIRO, RODRIGUES, 1997). Dessa maneira, a minimização de energia é um processo na qual se busca reduzir em conjunto essas penalidades, ou

seja, reduzir a energia a um mínimo, através de um algoritmo matemático adequado (SANT'ANNA, 2009).

Ao contrário do processo de mecânica molecular, a mecânica quântica considera em seus cálculos as interações entre elétrons e núcleos. Esses cálculos são realizados por meio de aproximações baseadas em dados empíricos e, portanto, não são exatos. O método *ab initio* e o método semi-empírico são subdivisões desse tipo de cálculo. A aplicação dos métodos *ab initio* é limitada a sistemas pequenos e requer maior tempo computacional. Os métodos semi-empíricos, por sua vez, podem ser aplicados em sistemas com 10 a 120 átomos e são mais rápidos, porém menos exatos (CARVALHO et al., 2003).

É importante ressaltar que as moléculas não são estáticas. Em sistemas reais, os átomos sofrem interferências em sua energia cinética, como por exemplo, pela temperatura da biofase. Essa energia cinética alterada permite que a molécula sofra mudanças conformacionais a todo o momento. Portanto, um modelo que considera só a conformação de menor energia gerada pela minimização é limitado. Nesse contexto, a aplicação de métodos de dinâmica molecular permite a obtenção da conformação mais estável. A dinâmica molecular compreende método de análise conformacional em que o modelo sofre estiramentos das suas ligações e alterações angulares, simulando o “aquecimento” da molécula e permitindo que barreiras energéticas sejam vencidas. A dinâmica molecular gera, ao longo do tempo, várias conformações com valores de energias diferentes, que devem ser analisados para se chegar a uma estrutura de conformação mais estável (CARVALHO et al., 2003; SANTA'ANNA, 2009). Portanto, a minimização de energia e a análise conformacional devem ser utilizadas em conjunto para a otimização da geometria da molécula.

Por fim, é importante lembrar que o uso de programas computacionais por si só não é suficiente para se obter um composto bioativo. Esse processo deve ser multidisciplinar, ou seja, devem-se combinar os recursos de modelagem molecular com os de síntese química e atividade biológica. A modelagem molecular representa uma ferramenta que pode facilitar e otimizar o processo de descoberta de

novos fármacos, mas não pode, jamais, substituir a parte experimental *in vivo* e *in vitro* (HEHRE, SHUSTERMAN, 2000; SANT'ANNA, 2002; EKINS, MESTRE, TESTA, 2007).

## 2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

As doenças cardiovasculares são consideradas problema de saúde pública de âmbito global, representando a maior causa de mortalidade e morbidade, independentemente do grau de desenvolvimento do país (CHAPMAN, 2007; FRANCO et al., 2011). Os índices de mortalidade por essas doenças, apresentados pelas estatísticas, são assustadores, principalmente quando se sabe que a maioria dessas mortes pode ser evitada com modificações no estilo de vida, como a prática de exercício físico e alimentação adequada.

A maioria das doenças cardiovasculares é proveniente de processo aterosclerótico de origem multifatorial, no qual a dislipidemia e a disfunção endotelial estão diretamente relacionadas (SANTOS *et al.*, 2007; WHO, 2011a). Os fatores de coagulação e as plaquetas também estão relacionados com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares por estarem envolvidos na formação do principal mediador de eventos vaso-oclusivos, o trombo (TOTH, 2008).

Com base na importância dos lipídeos no desenvolvimento da placa de ateroma e a influência da agregação plaquetária e dos fatores de coagulação na formação do trombo, a terapia farmacológica na prevenção primária e secundária das doenças cardiovasculares é voltada para o controle desses fatores. Vários fármacos hipolipemiantes que atuam na redução dos níveis de colesterol bem como agentes antitrombóticos (inibidores da agregação plaquetária e inibidores da trombina) e fibrinolíticos, que atuam impedindo a formação do trombo ou degradando o trombo já estabelecido, estão presentes na terapêutica (SBC, 2004; SBC, 2007). Entre esses fármacos, merece destaque a rosuvastatina, pertencente à classe dos inibidores da HMG-CoA redutase, fármacos de primeira escolha para o tratamento da dislipidemia e os inibidores da COX-1, em especial o ácido acetilsalicílico, inibidor da agregação plaquetária amplamente utilizado e com potencial reconhecido na prevenção de doenças cardiovasculares (GABRIEL *et al.*, 2006; GARCIA, JARAMILLO, 2008; CALZA, 2009).



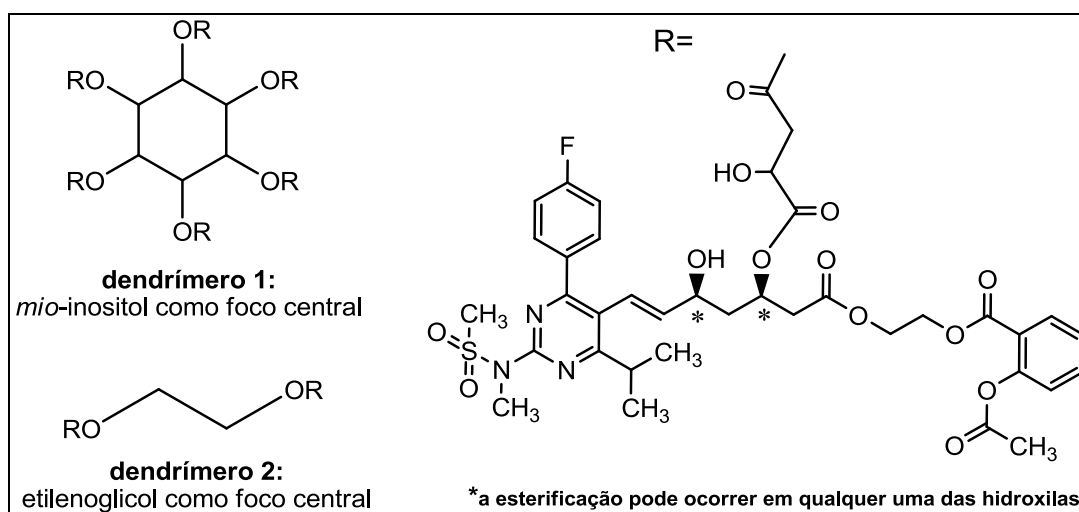
A partir do conhecimento da fisiopatologia da doença e do mecanismo de ação desses fármacos, a associação de ácido acetilsalicílico e estatinas representa escolha lógica na redução do risco cardiovascular em pacientes com doença arterial coronariana estabelecida. Essa lógica foi comprovada por Hennekens e colaboradores (2004), que consideraram a associação entre pravastatina e AAS vantajosa na redução dos riscos de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral. Estudo semelhante com a rosuvastatina ainda não foi realizado. Mas para este projeto acredita-se que os benefícios observados com a pravastatina sejam extrapolados para a rosuvastatina, que atualmente é a estatina mais potente e com menos efeitos adversos disponível na terapêutica nacional.

Face ao exposto e considerando as características promissoras dos dendrímeros como transportadores de fármacos, o objetivo principal desse trabalho foi desenvolver pró-fármacos dendriméricos de primeira geração contendo rosuvastatina e ácido acetilsalicílico, potencialmente ativo em doenças cardiovasculares, esperando obter liberação controlada, toxicidade reduzida e aumento da eficácia dos compostos bioativos.

Os dendrímeros serão construídos utilizando como referência o pedido de patente de Ferreira e Giarolla (2008), em que os *dendrons* são compostos pelos fármacos, o que leva ao aumento exponencial dos compostos ativos a cada subsequente geração. Duas estruturas dendriméricas foram propostas para este trabalho, sendo a diferença entre elas o foco central utilizado (Figura 30). Os focos centrais escolhidos foram *mio*-inositol (dendrímero 1) e etilenoglicol (dendrímero 2). O etilenoglicol também foi utilizado como espaçante na síntese do pró-fármaco dendrimérico, sendo a sua função ligar a molécula de ácido acetilsalicílico à molécula de rosuvastatina. Outro espaçante utilizado foi o ácido málico, responsável por ligar o foco central aos fármacos e, também, permitir o crescimento da malha dendrimérica por meio da sua hidroxila livre.

Para este projeto também foi proposto utilizar a modelagem molecular como ferramenta na avaliação preliminar da liberação desses

compostos, seguindo o protocolo utilizado por Giarolla e colaboradores (2010).



**Figura 30.** Estruturas propostas para os pró-fármacos dendriméricos de primeira geração contendo rosuvastatina e ácido acetilsalicílico utilizando diferentes focos centrais.

# *Material e Métodos*

*Nada é difícil se for dividido em pequenas partes.*

*Henry Ford*

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Reagentes e solventes

- 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC);
- 2,2-dimetoxipropano;
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP);
- 4-nitrofenilcloroformato;
- acetato de etila;
- acetona;
- acetonitrila;
- ácido acético glacial;
- ácido acetilsalicílico (AAS);
- ácido clorídrico;
- ácido L(-)-málico;
- ácido *p*-toluenossulfônico;
- ácido sulfúrico;
- água deuterada;
- álcool metílico;
- bicarbonato de sódio;
- carbonildiimidazol (CDI);
- cloreto de sódio;
- cloroformato de etila;
- cloreto de oxalila;
- cloreto de *tert*-butildimetilsilano (TBDMSCl);
- cloreto de tionila;
- clorofórmio;
- clorofórmio deuterado;
- dicitcloexilcarbodiimida (DCC);

- diclorometano;
- dimetilformamida (DMF);
- dimetilsulfóxido deuterado;
- éter etílico;
- etilenoglicol;
- hidróxido de sódio;
- hexano;
- imidazol;
- *mio*-inositol;
- *N*-metilmorfolina;
- piridina;
- rosuvastatina cálcica;
- sulfato de sódio anidro;
- sulfato de magnésio anidro;
- tetracloreto de carbono;
- tetraidrofurano (THF).

### 3.1.2 Equipamentos

- espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker 300 MHz, modelo *Advanced* DPX-300;
- microondas para síntese CEM, modelo Discover;
- rotaevaporador Büchi.
- Cromatógrafo automático Isolera Prime, Biotage.

### 3.1.3 Softwares para modelagem molecular

- Accelrys ViewerLite 5.0 (Accelrys Inc.);
- Gaussian G03 (Gaussian 03W for Windows, version 6);
- HyperChem 7.51 (HyperChem Program Release 7 for Windows);
- MOLSIM 3.2 (DOHERTY, 1997).

### 3.1.4 Software para edição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear

- MestreC 4.7

## 3.2 MÉTODOS

## 3.2.1 Síntese

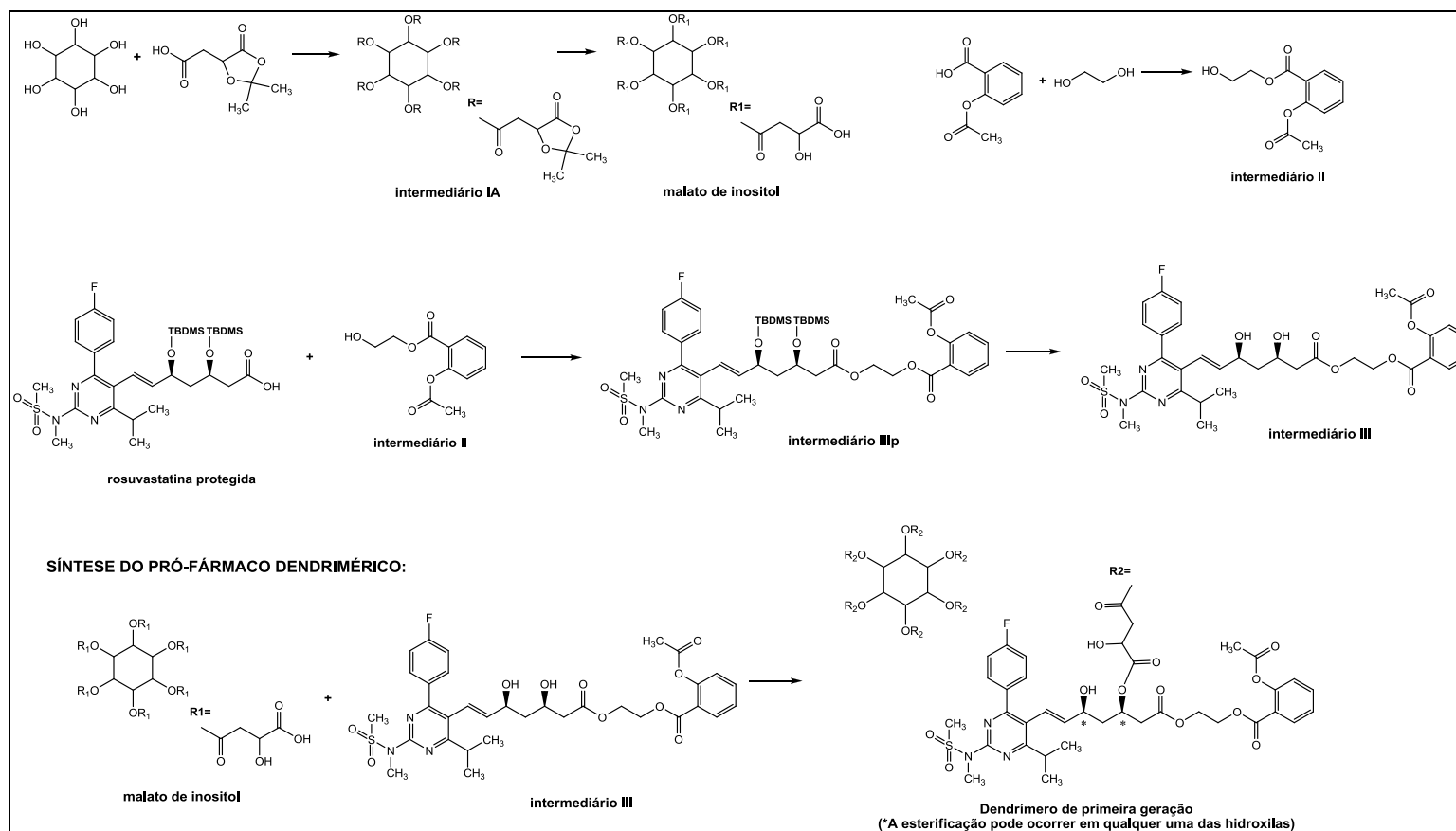


Figura 31. Esquema geral de síntese do dendrímico proposto utilizando *myo*-inositol como foco central. TBDMS: *tert*-butildimetilsilano.

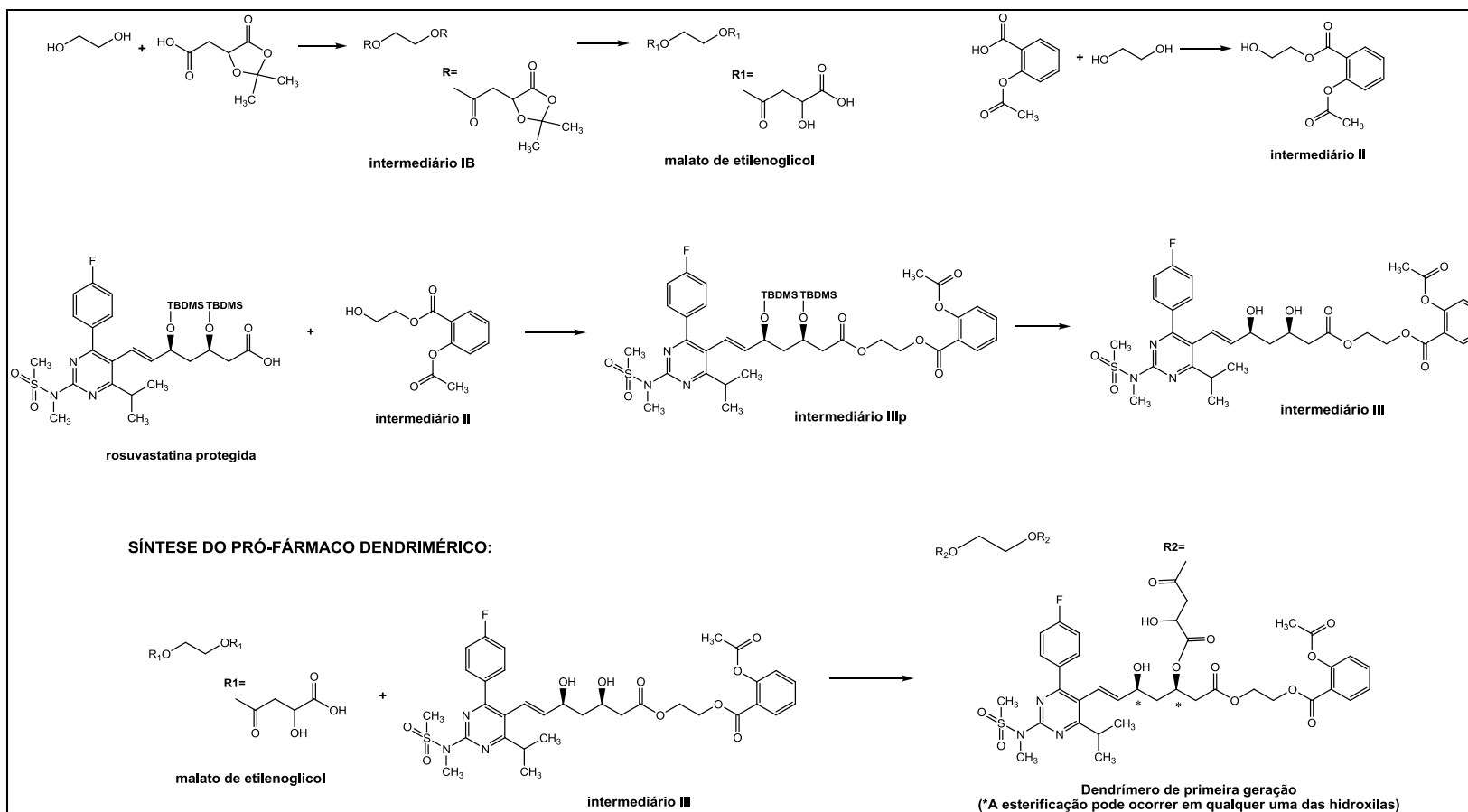
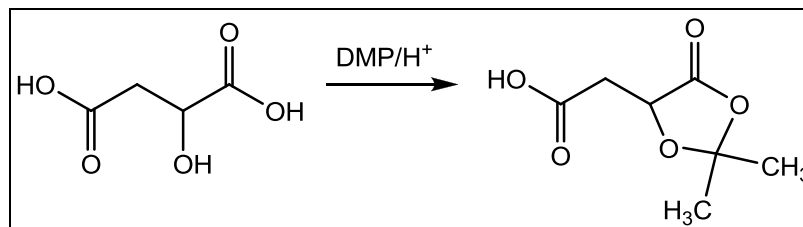


Figura 32. Esquema geral de síntese do dendrîmero proposto utilizando etilenoglicol como foco central. TBDMS: *terc*-butildimetilsilano.



3.2.1.1 Síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético (ácido málico protegido) (GREEN, KIDDLE, THOMPSON, 1995; GIAROLLA, 2007)



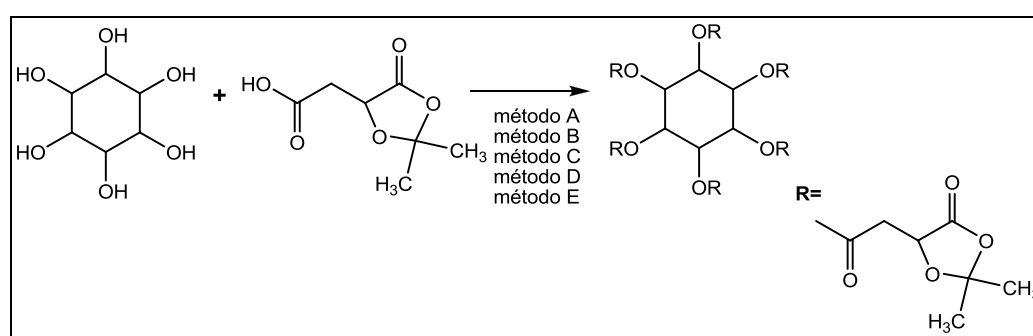
**Figura 33.** Síntese do ácido málico protegido (GIAROLLA, 2007).

Manteve-se sob agitação magnética e à temperatura ambiente o ácido L(-)-málico (7,50 mmol), ácido *p*-toluenossulfônico (0,16 mmol) e 2,2-dimetoxipropano (20,33 mmol). Após 30 minutos, adicionou-se água (150 mL) e o produto foi extraído com diclorometano (três vezes com 150 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secadas com sulfato de sódio anidro e filtradas. O solvente foi removido sob pressão reduzida a 50 °C, e o produto obtido foi recristalizado em clorofórmio/tetracloroeto de carbono 1:1 (v/v).

### 3.2.1.2 Síntese do pró-fármaco dendrimérico de primeira geração

Os estudos sintéticos foram realizados com a colaboração da aluna de iniciação científica Ana Luisa Lampert Cadore, da doutoranda Soraya da Silva Santos e dos pós-doutorandos Jeanine Giarolla Vargas, Fabrício Vargas, Marco Aurélio da Graça Arribas e Márcio Henrique Zaim.

#### 3.2.1.2.1 Síntese do intermediário IA – *mio*-inositol como foco central



**Figura 34.** Síntese do intermediário IA utilizando *mio*-inositol como foco central do dendrímero.

- Método A: método utilizando dicicloexilcarbodiimida (DCC) como agente condensante
- Experimentos A1, A2 e A3

Foram mantidos em banho de gelo e sob agitação magnética o ácido málico protegido (AMP) e o agente condensante DCC nas concentrações molares e no solvente indicado pela Tabela 1. Após 30 minutos, retirou-se o banho de gelo e adicionou-se a 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e o *mio*-inositol, com exceção dos experimentos A2 e A3, que não utilizam DMAP. Manteve-se a agitação à temperatura ambiente conforme as condições descritas na Tabela 1. Ao término da reação, o conteúdo reacional foi filtrado por filtração simples e, posteriormente, adicionou-se o solvente adequado ao filtrado, que foi

extraído em etapas (Tabela 1). A fase orgânica obtida foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 50 °C.

A reação foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD), com fase móvel clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) no experimento A1 e hexano/acetato de etila 2:1 (v/v) nos experimentos A2 e A3.

Os procedimentos realizados para purificação do produto obtido no método A2 e A3 estão descritos na Tabela 1.

- Experimento A4

Manteve-se sob agitação magnética e banho de gelo o ácido málico protegido, o *mio*-inositol e o DMAP nas concentrações molares e no solvente indicado pela Tabela 1. O DCC foi adicionado ao pouco ao conteúdo reacional, por 5 minutos. Após esse período, o banho de gelo foi removido e manteve-se a agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Ao término da reação, o meio reacional foi filtrado sob pressão reduzida. Ao filtrado obtido, adicionou-se o solvente adequado para posterior extração, seguindo o procedimento descrito na Tabela 1. A cada etapa da extração, filtrou-se a camada orgânica sob pressão reduzida. A fase orgânica obtida foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

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

O procedimento realizado para purificação do produto obtido no experimento A4 está descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Condições de reação, tratamento e purificação para os experimentos A1, A2, A3 e A4

Experi- mento	Reagentes/ solvente	Concentração molar/ volume	Condições reacionais	Tratamento da reação	Purificação	Referência
<b>A1</b>	AMP DCC <i>mio</i> -inositol DMAP THF	1,50 mmol 1,50 mmol 0,25 mmol 0,15 mmol 30 mL	8 horas T.A.	acetato de etila (70 mL) <b>Extração:</b> NaHCO <sub>3</sub> * (100 mL x1) água (100 mL x1) NaCl* (100 mL x1)	-	adaptado de DAMEN et al., 2000.
<b>A2</b>	AMP DCC <i>mio</i> -inositol THF	2,87 mmol 2,87 mmol 4,35 mmol 30 mL	26 horas T.A.	acetato de etila (50 mL) <b>Extração:</b> NaHCO <sub>3</sub> * (50 mL x2) NaCl* (50 mL x2)	coluna cromatográfica hexano/acetato de etila (gradiente de concentração)	adaptado de DELONG et al., 2007.
<b>A3</b>	AMP DCC <i>mio</i> -inositol THF	2,87 mmol 2,87 mmol 4,35 mmol 30 mL	24 horas T.A.	acetato de etila (50 mL) <b>Extração:</b> NaHCO <sub>3</sub> * (50 mL x2) NaCl* (50 mL x2)	precipitação em diclorometano com baixa temperatura (congelador)	adaptado de DELONG et al., 2007.
<b>A4</b>	AMP DCC <i>mio</i> -inositol DMAP DMF anidro	1,00 mmol 1,00 mmol 3,00 mmol 0,80 mmol 20 mL	24 horas T.A.	diclorometano (50 mL) <b>Extração:</b> HCl 0,5 M (70 mL x2) NaHCO <sub>3</sub> * (70 mL x2) (filtração a cada etapa)	precipitação em éter etílico com baixa temperatura (congelador)	adaptado de NEISES, STEGLICH, 1985.

\*solução saturada/T.A.: temperatura ambiente

- Método B: método do anidrido misto utilizando 4-nitrofenilcloroformato (adaptado de VARGAS, 2007)

Em banho de gelo e agitação magnética, adicionou-se solução de *N*-metilmorfolina (8,90 mmol) em 1 mL clorofórmio à solução de ácido málico protegido (8,62 mmol) em 3 mL de clorofórmio. Agitou-se por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se o 4-nitrofenilcloroformato (8,90 mmol) solubilizado em 1 mL de clorofórmio. Após 30 minutos, adicionou-se a solução de *mio*-inositol (1,44 mmol) em 1 mL de clorofórmio. Manteve-se a agitação e o banho de gelo por mais 1 hora. Posteriormente, o banho de gelo foi retirado e a reação foi mantida à temperatura ambiente por 24 horas. Ao término da reação, diluiu-se a mistura reacional com 50 mL de diclorometano e extraiu-se, subseqüentemente, com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M (duas vezes com 10 mL), solução saturada de cloreto de sódio (10 mL), solução aquosa de ácido clorídrico 1 M (duas vezes com 10 mL) e, novamente, com solução saturada de cloreto de sódio (10 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

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

- Método C: utilizando carbonildiimidazol (CDI) como agente condensante

Sob atmosfera inerte de nitrogênio e agitação magnética, adicionou-se o ácido málico protegido e o CDI em solvente e concentrações molares descritas na Tabela 2. Após o tempo de reação T1 adicionaram-se o *mio*-inositol e o DMAP (este último somente para o experimento C1), ao meio reacional (Tabela 2). O sistema foi aquecido a 80 °C e manteve-se a agitação pelo tempo de reação T2, de acordo com a Tabela 2. Ao término da reação, adicionou-se o solvente adequado e o produto foi extraído em etapas (Tabela 2). A fase orgânica foi secada com

sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

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

Tabela 2. Condições de reação e tratamento para os experimentos C1, C2, C3, C4

Experimento	Reagentes/ solvente	Concentração molar/volume	Condições de reação	Tratamento da reação	Referência
<b>C1</b>	AMP CDI <i>mio</i> -inositol DMAP DMF anidro	1,00 mmol 1,00 mmol 0,16 mmol 0,10 mmol 20 mL	<b>T1:</b> 30 minutos T.A. <b>T2:</b> 24 horas 80 °C	acetato de etila (30 mL) <b>Extração:</b> NaHCO <sub>3</sub> * (30 mL x1) água (30 mL x1) NaCl* (30 mL x1)	adaptado de ABOUSSAFY et al., 2010.
<b>C2</b>	AMP CDI <i>mio</i> -inositol DMF anidro	1,00 mmol 1,50 mmol 1,00 mmol 15 mL	<b>T1:</b> 10 minutos T.A. <b>T2:</b> 3 horas 80 °C	acetato de etila (30 mL) <b>Extração:</b> NaCl (30 mL x2) água (30 mL x2)	adaptado de BODE et al., 2010.
<b>C3</b>	AMP CDI <i>mio</i> -inositol DMF anidro	1,00 mmol 1,50 mmol 1,00 mmol 20 mL	<b>T1:</b> 8 horas T.A. <b>T2:</b> 24 horas 80 °C	acetato de etila (30 mL) <b>Extração:</b> NaHCO <sub>3</sub> * (30 mL x1) NaCl* (30 mL x1) água (30 mL x1)	adaptado de HUSSAIN, LIEBERT, HEINZE, 2004.
<b>C4</b>	AMP CDI <i>mio</i> -inositol DMF anidro	1,00 mmol 1,50 mmol 2,50 mmol 15 mL	<b>T1:</b> 5 minutos T.A. <b>T2:</b> 16 horas 80 °C	acetato de etila (30 mL) <b>Extração:</b> água (30 mL x1) NaHCO <sub>3</sub> * (30 mL x1) NaCl* (30 mL x1)	adaptado de TUKULULA, 2009.

\*solução saturada / T.A.: temperatura ambiente

- Método D: método do cloreto de ácido utilizando cloreto de tionila (adaptado de HOSAGANDI, DAVE, 1996)

Em atmosfera inerte de nitrogênio e banho de gelo, adicionou-se o ácido málico protegido (5,70 mmol) e, aos poucos, o cloreto de tionila (8,55 mmol) em 20 mL de DMF anidro. Após 20 minutos, adicionou-se, gota a gota, solução de 5 mL de DMF anidro contendo *mio*-inositol (0,95 mmol) e piridina anidra (3,00 mmol). Posteriormente, retirou-se o banho de gelo e o sistema foi aquecido a 80 °C por 3 horas.

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

- Método E: método utilizando 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (adaptado de HORVATH, DEPRÉ, ORMEROD, 2008)

- Experimento E1

Adicionou-se, sob agitação magnética e à temperatura ambiente, o ácido málico protegido (5,30 mmol) e o EDC (5,80 mmol) em 20 mL de DMF. Após 15 minutos, adicionou-se ao meio reacional o *mio*-inositol (5,60 mmol) e o DMAP (0,50 mmol). Manteve-se a agitação e o sistema foi aquecido a 80 °C, por 24 horas. Ao término da reação, adicionou-se acetato de etila (50 mL) e o conteúdo reacional foi extraído em etapas com solução aquosa de ácido clorídrico 1 M (duas vezes com 50 mL) e com solução saturada de cloreto de sódio (duas vezes com 50 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 50 °C.

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



- Experimento E2: síntese em reator de micro-ondas

Em reator de micro-ondas, adicionaram-se o ácido málico protegido (5,30 mmol), EDC (5,80 mmol), *mio*-inositol (5,60 mmol) e o DMAP (0,50 mmol) em 20 mL de DMF. Manteve-se o conteúdo reacional sob agitação magnética, seguindo-se as condições reacionais descritas na Tabela 3. As etapas da Tabela 3 foram realizadas para uma única reação.

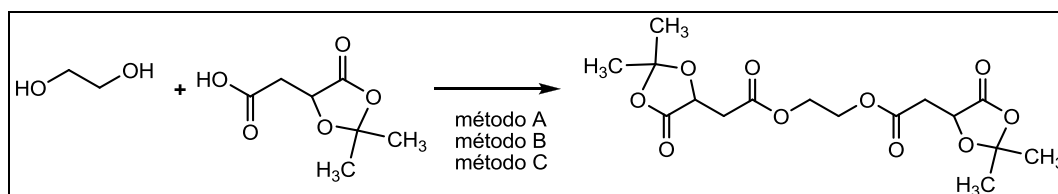
A reação foi acompanhada ao final de cada etapa por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol 4:1 (v/v). Esse procedimento foi realizado sete vezes (Tabela 3).

**Tabela 3.** Condições de reação em micro-ondas para o experimento E2.

<b>Etapa</b>	<b>Potência (W)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (minutos)</b>
<b>1</b>	50 W	100	7
<b>2</b>	50 W	120	7
<b>3</b>	70 W	120	7
<b>4</b>	70 W	130	10
<b>5</b>	70 W	140*	10
<b>6</b>	70 W	150*	10
<b>7</b>	70 W	160*	10

\*sistema sob refluxo

### 3.2.1.2.2 Síntese do intermediário IB – etilenoglicol como foco central



**Figura 35.** Síntese do intermediário IB utilizando etilenoglicol como foco central do dendrímero.

➤ **Método A: método do anidrido misto (adaptado de VARGAS, 2007)**

Em banho de gelo e agitação magnética, adicionou-se a solução de *N*-metilmorfolina em 3 mL de THF à solução de ácido málico protegido dissolvido em 3 mL de THF, considerando as concentrações molares descritas na Tabela 4. Agitou-se por 15 minutos e, em seguida, adicionou-se o clorofornato de etila (experimento A1) ou o 4-nitrofenilclorofornato (experimento A2) solubilizado em 3 mL de THF (Tabela 4). Manteve-se a agitação por mais 30 minutos e adicionou-se a solução de etilenoglicol em 3 mL de THF (Tabela 4). Após 1 hora, retirou-se o banho de gelo e manteve-se a agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Ao término da reação, diluiu-se a mistura reacional com 50 mL de acetato de etila e extraiu-se, subseqüentemente, com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M (duas vezes com 15 mL), solução saturada de cloreto de sódio (15 mL), solução aquosa de ácido clorídrico 1 M (duas vezes com 15 mL) e, novamente, com solução saturada de cloreto de sódio (15 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e removeu-se o solvente em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

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

**Tabela 4.** Condições de reação e tratamento para os experimentos A1 e A2

Experimento	Reagentes	Concentração molar (mmol)	Condições de reação
<b>A1</b>	AMP	5,75	24 horas T.A.
	cloroformato de etila	1,25	
	etilenoglicol	2,85	
	<i>N</i> -metilmorfolina	1,25	
<b>A2</b>	AMP	1,00	24 horas T.A.
	4-nitrofenilcloroformato	1,25	
	etilenoglicol	0,10	
	<i>N</i> -metilmorfolina	1,00	

T.A.: temperatura ambiente

➤ Método B: método utilizando EDC como agente condensante

Adicionaram-se, sob agitação magnética, o ácido málico protegido e o EDC em solvente, concentrações molares e condições reacionais descritas na Tabela 5. Após tempo de reação T1, adicionou-se o etilenoglicol e o DMAP e manteve-se a agitação pelo tempo de reação T2 e condições reacionais adequadas (Tabela 5). Ao término da reação, adicionou-se o solvente adequado e o conteúdo foi extraído em etapas de acordo com o procedimento de tratamento da reação (Tabela 5). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

A reação foi acompanhada por CCD, em fase móvel clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) para o experimento B1 e hexano/acetato de etila 1:1 (v/v) para o experimento B2.

O produto obtido no experimento B2 foi purificado por coluna cromatográfica utilizando hexano/acetato de etila como fase móvel, em gradiente de concentração.

Tabela 5. Condições de reação e tratamento para os experimentos C1 e C2

Experimento	Reagentes/solventes	Concentração molar dos reagentes/ volume	Condições de reação	Tratamento da reação	Referência
<b>B1</b>	AMP EDC etilenoglicol DMAP THF	5,75 mmol 6,27 mmol 2,85 mmol 2,85 mmol 30 mL	<b>T1:</b> 30 minutos Banho de gelo <b>T2:</b> 24 horas 50 °C (refluxo)	acetato de etila (50 mL) <b>Extração:</b> água (70 mL x3)	adaptado de GOLDBERG, GHANDEHARI, SWAAN, 2010; GIAROLLA, 2012.
<b>B2</b>	AMP EDC etilenoglicol DMAP diclorometano	5,30 mmol 5,80 mmol 5,60 mmol 0,50 mmol 20 mL	<b>T1:</b> 15 minutos T.A. <b>T2:</b> 24 horas T.A.	diclorometano (30 mL) <b>Extração:</b> HCl 1 M (50 mL x2) NaCl* (50 mL x2)	adaptado de HORVATH, DEPRÉ, ORMEROD, 2008.

\*solução saturada

T.A.: temperatura ambiente

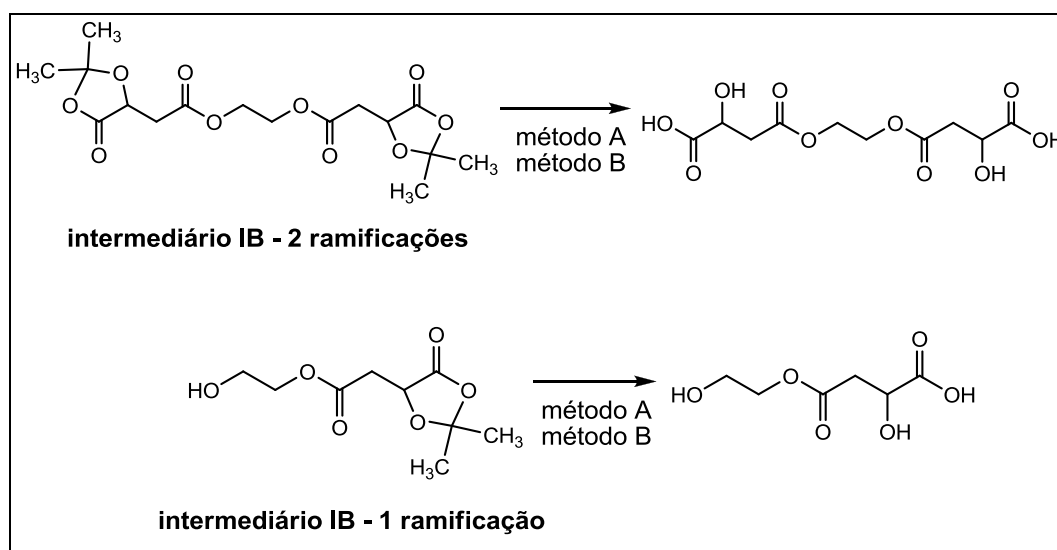
- Método C: método utilizando CDI como agente condensante (adaptado de AL-MASRI et al., 2012)

Em atmosfera inerte de nitrogênio e sob agitação magnética à temperatura ambiente, adicionaram-se o ácido málico protegido (5,40 mmol) e o CDI (5,50 mmol) em 15 mL de THF anidro. Após 15 minutos, adicionou-se ao meio reacional o etilenoglicol (2,70 mmol) e o DMAP (0,54 mmol). Manteve-se a agitação em atmosfera inerte por 24 horas. Após esse período, adicionou-se diclorometano (30 mL) e extraiu-se o conteúdo reacional com água (duas vezes com 50 mL), solução aquosa de ácido clorídrico 1 M (duas vezes com 50 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (duas vezes com 50 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

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

O produto obtido foi purificado por coluna cromatográfica utilizando hexano/acetato de etila como eluente em gradiente de concentração.

### 3.2.1.2.3 Síntese do malato de etilenoglicol



**Figura 36.** Síntese do malato de etilenoglicol.

- Método A: método utilizando solução aquosa de ácido clorídrico (adaptado de MANTELL, 2007)

O intermediário IB com 1 ramificação (1 RAM), ou 2 ramificações (2 RAM), foi dissolvido em solução aquosa de ácido clorídrico e acetonitrila, sob agitação magnética, seguindo as condições e concentrações molares descritas pela Tabela 6. Manteve-se a agitação à temperatura ambiente (Tabela 6). Ao término da reação, o meio reacional dos experimentos A2, A3 e A4 foi tratado de acordo com o procedimento da Tabela 6. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

No experimento A1, o solvente foi removido sob pressão reduzida, em rotaevaporador, a 50 °C sem tratamento prévio.

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

**Tabela 6.** Condições de reação e tratamento para os experimentos A1, A2 e A3

Experi- mento	Reagentes/ solventes	Concentração molar/ volume	Condições reacionais	Tratamento da reação
<b>A1</b>	intermediário IB (1 RAM) HCl 1 M acetonitrila	2,58 mmol 14 mL 14 mL	3 horas T.A.	-
<b>A2</b>	intermediário IB (2 RAM) HCl 0,5 M acetonitrila	0,23 mmol 12 mL 12 mL	3 horas T.A.	acetato de etila (30 mL) <b>Extração:</b> água (30 mL x3)
<b>A3</b>	intermediário IB (2 RAM) HCl 0,1 M acetonitrila	0,70 mmol 21 mL 21 mL	3 horas T.A.	acetato de etila (30 mL) <b>Extração:</b> água (30 mL x3)

T.A.: temperatura ambiente

- Método B: método utilizando ácido acético glacial (adaptado de DAMEN et al., 2000)

O intermediário IB, com 1 ramificação (1 RAM) ou 2 ramificações (2 RAM), foi dissolvido, sob agitação magnética, em ácido acético glacial, THF e água seguindo as condições e concentrações molares descritas na Tabela 7. Manteve-se a agitação à temperatura ambiente e em tempo indicado pela Tabela 7. Ao término da reação, o conteúdo reacional foi tratado com o procedimento adequado para cada método (Tabela 7). Após o tratamento, a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C. Durante a remoção do solvente, o produto foi lavado exaustivamente com acetato de etila e, posteriormente, com diclorometano.

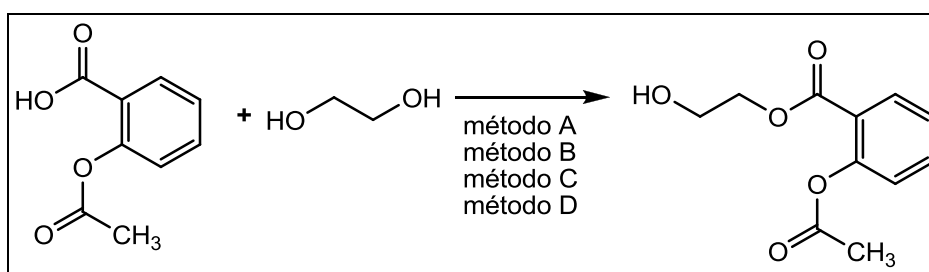
A reação foi acompanhada por CCD, em fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v).

**Tabela 7.** Condições de reação e tratamento para os experimentos B1 e B2

Experi-mento	Reagentes/ solventes	Concentração molar /volume	Condições reacionais	Tratamento da reação
<b>B1</b>	intermediário IB (1 RAM) ácido acético glacial THF água	0,53 mmol 10 mL 10 mL 10 mL	2 horas T.A.	acetato de etila (30 mL) <b>Extração:</b> Água (30 mL x5)
<b>B2</b>	intermediário IB (2 RAM) ácido acético glacial THF água	0,78 mmol 16 mL 4 mL 8 mL	4 horas T.A.	acetato de etila (30 mL) <b>Extração:</b> água (30 mL x5)

T.A.: temperatura ambiente

## 3.2.1.2.4 Síntese do intermediário II

**Figura 37.** Síntese do intermediário II.

- Método A: método utilizando DCC como agente condensante (adaptado de DAMEN et al., 2000)

Sob agitação magnética e banho de gelo, adicionou-se o ácido acetilsalicílico (AAS) (1,00 mmol) e o DCC (1,00 mmol) em 30 mL de THF. Após 30 minutos, o banho de gelo foi retirado e adicionaram-se o DMAP (0,10 mmol) e o etilenoglicol (2,00 mmol). Manteve-se a reação em agitação magnética e à temperatura ambiente por 24 horas. Ao final desse período, o conteúdo reacional foi filtrado por filtração simples. Em seguida, adicionaram-se 70 mL de acetato de etila ao filtrado, que foi



extraído em etapas com 50 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio, 50 mL de água e 50 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Após a extração, a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

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

➤ Método B: método do anidrido misto (adaptado de VARGAS, 2007)

Adicionou-se, em banho de gelo e agitação magnética, solução de *N*-metilmorfolina em 1 mL de THF à solução de AAS em 3 mL de THF. Agitou-se por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se o cloroformato correspondente (Tabela 8), solubilizado em 1 mL de THF. Após 30 minutos, adicionou-se solução de etilenoglicol em 1 mL de THF. Manteve-se a agitação e o banho de gelo por 1 hora. Posteriormente, o banho de gelo foi retirado e a reação foi mantida de acordo com as condições descritas na Tabela 8. Ao término da reação, diluiu-se o meio reacional com 50 mL de acetato de etila (experimento B1) ou 50 mL de diclorometano (experimentos B2 e B3) e lavou-se, subsequentemente, com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M (duas vezes com 15 mL), solução saturada de cloreto de sódio (15 mL), solução aquosa de ácido clorídrico 1 M (duas vezes com 15 mL) e, novamente, com solução saturada de cloreto de sódio (15 mL). A fase orgânica foi secada em sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

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

**Tabela 8.** Condições de reação e tratamento para os métodos B1, B2, B3

Experimento	Reagentes	Concentração molar (mmol)	Condições reacionais
<b>B1</b>	AAS	1,00	Tempo: 72 horas T.A
	etilenoglicol	2,00	
	cloroformato de etila	1,00	
	<i>N</i> -metilmorfolina	1,00	
<b>B2</b>	AAS	1,00	Tempo: 72 horas T.A.
	etilenoglicol	2,00	
	4-nitrofenilcloroformato	2,20	
	<i>N</i> -metilmorfolina	2,20	
<b>B3</b>	AAS	1,00	Tempo: 50 horas Refluxo a 60 °C
	etilenoglicol	10,0	
	4-nitrofenilcloroformato	2,20	
	<i>N</i> -metilmorfolina	2,20	

\*T.A.: temperatura ambiente

➤ Método C: método do cloreto de ácido

Em atmosfera inerte de argônio e agitação magnética, adicionou-se o AAS e, aos poucos, o cloreto de ácido correspondente, seguindo as condições reacionais, solvente e concentrações molares descritas na Tabela 9. Após tempo de reação T1, adicionou-se, gota a gota, solução de etilenoglicol e piridina anidra no meio reacional. Manteve-se a agitação em atmosfera inerte de argônio por tempo de reação T2 e as condições de reação indicadas pela Tabela 9. Após o tempo de reação T2, o solvente da reação foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C e, posteriormente, adicionou-se o solvente adequado (Tabela 9). O produto foi extraído em etapas seguindo o procedimento da Tabela 9. A fase orgânica foi secada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e o solvente foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

A reação foi acompanhada por CCD, em fase móvel clorofórmio/metanol 9:1 (v/v).

Purificou-se o produto por coluna cromatográfica, utilizando clorofórmio/metanol como fase móvel em gradiente de concentração.

**Tabela 9.** Condições de reação e tratamento para os métodos C1 e C2

Experimento	Reagentes/solvente	Concentração molar/ volume	Condições reacionais	Tratamento da reação	Referência
<b>C1</b>	AAS etilenoglicol cloreto de oxalila piridina anidra acetona anidra	1,00 mmol 10,60 mmol 3,40 mmol 5,30 mmol 30 mL	<b>T1:</b> 1 hora banho de gelo <b>T2:</b> 24 horas banho de gelo	acetato de etila (70 mL) <b>Extração:</b> água (40 mL x2) NaHCO <sub>3</sub> * (40 mL x3)	adaptado de MINEMOTO, 2006.
<b>C2</b>	AAS etilenoglicol cloreto de tionila piridina anidra acetona anidra	1,00 mmol 20,00 mmol 10,00 mmol 2,00 mmol 15 mL	<b>T1:</b> 15 minutos banho de gelo <b>T2:</b> 24 horas aquecimento 60 °C (refluxo)	água (50 mL) <b>Extração:</b> acetato de etila (50 mL x3)	adaptado de JIANG, 2010.

\*solução saturada

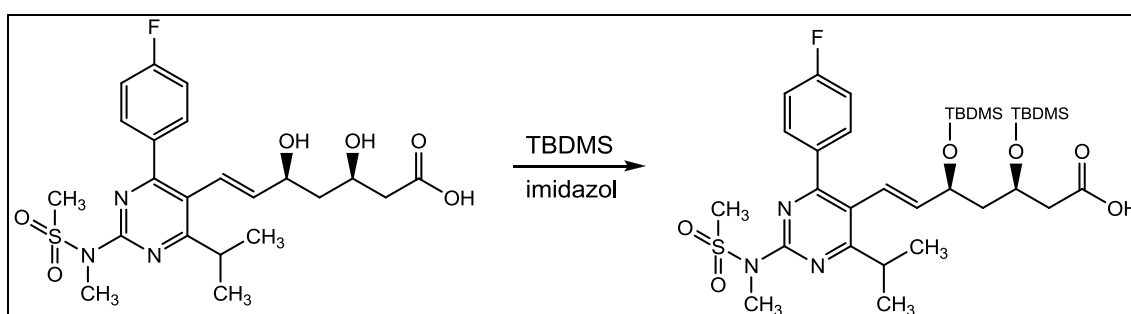
➤ Método D: método utilizando EDC como agente condensante

Manteve-se, sob agitação magnética e à temperatura ambiente, o AAS (5,30 mmol) e o EDC (5,80 mmol) em 20 mL de acetona. Após 15 minutos, adicionaram-se o DMAP (0,50 mmol) e o etilenoglicol (5,60 mmol) e manteve-se a agitação magnética por 24 horas. Ao final desse período, o solvente foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C. Posteriormente, adicionaram-se 30 mL de diclorometano ao produto e, em seguida, o material foi extraído com solução aquosa de ácido clorídrico 1 M (duas vezes com 50 mL) e solução saturada de cloreto de sódio (duas vezes com 50 mL). A fase orgânica obtida foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

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

O produto obtido foi purificado por coluna cromatográfica, com fase móvel hexano/acetato de etila em gradiente de concentração.

### 3.2.1.2.5 Síntese da rosuvastatina protegida (COREY, VENKATESWARLU, 1972)



**Figura 38.** Síntese da rosuvastatina protegida.

Adicionou-se, sob temperatura ambiente, atmosfera inerte de argônio e ao abrigo da luz, a rosuvastatina (1 mmol) e o imidazol (5 mmol) em 2 mL de DMF anidro. Em seguida, adicionou-se o cloreto de *tert*-butildimetilsilano (TBDMSCl) (2,4 mmol). Mantiveram-se as condições reacionais por 12 horas. Ao término desse período, adicionou-se acetato de etila ao meio reacional (20 mL) e o produto foi extraído com água (cinco vezes com 30 mL). A fase

orgânica foi secada sob sulfato de magnésio anidro, filtrada e o solvente removido em rotaevaporador, sob pressão reduzida, a 50 °C.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel clorofórmio/metanol 9:1 (v/v).

O produto obtido foi purificado em cromatógrafo automático Isolera Prime, com fase móvel clorofórmio/metanol em gradiente de concentração.

### 3.2.2 Métodos de análise dos compostos obtidos

#### 3.2.2.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi realizada em Espectrômetro Bruker 300 MHz, modelo *Advanced* DPX-300, disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

#### 3.2.2.2 Análise Cromatográfica

➤ Em camada delgada

A análise cromatográfica em camada delgada foi realizada em cromatoplasmas de sílica-gel com as fases móveis adequadas para cada metodologia anteriormente descrita.

➤ Em coluna

A análise cromatográfica em coluna foi realizada com sílica-gel 70-230 mesh e em cromatógrafo automático, com as fases móveis adequadas para cada metodologia anteriormente descrita.

### 3.2.3 Modelagem molecular

Os estudos de modelagem molecular contaram com a colaboração da mestrandia Soraya da Silva Santos, da pós-doutoranda Jeanine Giarolla Vargas e da Dra. Kerly F. M. Pasqualoto, do Instituto Butantan.

#### 3.2.3.1 Estudo *in silico* de liberação dos pró-fármacos dendriméricos de primeira geração (GIAROLLA et al., 2010)

As estrutura dos dendrímeros de primeira geração com uma e duas ramificações contendo *mio*-inositol (foco central), etilenoglicol (foco central e espaçante), ácido L(-)-málico (espaçante), ácido acetilsalicílico e rosuvastatina (compostos bioativos), foram construídas em suas formas neutras no programa HyperChem 7.51, a partir das coordenadas cartesianas extraídas do *Protein Data Bank* (PDB). Os códigos das estruturas utilizadas na construção dos dendrímeros e as respectivas resoluções estão no Quadro 2.

**Quadro 2.** Informações sobre os dados cristalográficos utilizados na construção dos modelos utilizados no estudo *in silico* de liberação

	<b>Código de entrada no PDB</b>	<b>Resolução</b>	<b>Referência</b>
rosuvastatina	1HWL	2,10 Å	ISTVAN, DEISENHOFER, 2001.
ácido acetilsalicílico	1TGM	1,86 Å	SINGH et al., no prelo.
etilenoglicol	3AT2	1,60 Å	KINOSHITA et al., 2011.
<i>mio</i> -inositol	3HO6	1,60 Å	PRUITT et al., 2009.
ácido L(-)-málico	3DR3	2,00 Å	SINGER et al., no prelo.

Os modelos construídos com uma e duas ramificações contendo *mio*-inositol ou etilenoglicol como foco central foram minimizados utilizando o método de mecânica molecular em campo de força empírico MM+, sem

qualquer restrição, nos programas nos HyperChem 7.51 e MOLSIM 3.2 (DOHERTY, 1997). Calcularam-se as cargas atômicas parciais implementando o método semiempírico em campo de força AM1, também no programa HyperChem 7.51.

Posteriormente, os modelos de energia baixa foram submetidos a simulações de dinâmica molecular, realizadas em protocolo de 1 ns, cada passo 1 fs, à temperatura de 310 K. Os arquivos trajetória foram salvos a cada 20 passos, resultando em 50.000 conformações. Posteriormente, gerou-se o perfil de amostragem conformacional e dele extraiu-se a conformação de menor energia para cada modelo da região de equilíbrio. Utilizaram-se estes confôrmeros, após minimização de energia, para o cálculo de cargas atômicas parciais de potencial eletrostático (ChelpG) com método *ab initio* HF/3-21G\* (Gaussian G03W). O mapa de potencial eletrostático (MPE) foi calculado em superfície Connolly e visualizado na faixa de coloração de  $-8,4 \text{ eV}^{-2}$  (vermelho intenso, maior distribuição de densidade eletrônica) a  $8,4 \text{ eV}^{-2}$  (azul intenso, menor distribuição de densidade eletrônica) (Gaussview).

O programa Viewer Lite 5.0 foi utilizado para determinar o número de ligações de hidrogênio e para gerar a superfície de acessibilidade ao solvente, determinando o impedimento estérico dos modelos.



## *Resultados e Discussão*

*Quantas vezes a gente, em busca da ventura,*

*Procede tal e qual o avozinho infeliz:*

*Em vão, por toda parte, os óculos procura*

*Tendo-os na ponta do nariz!*

*Mário Quintana*

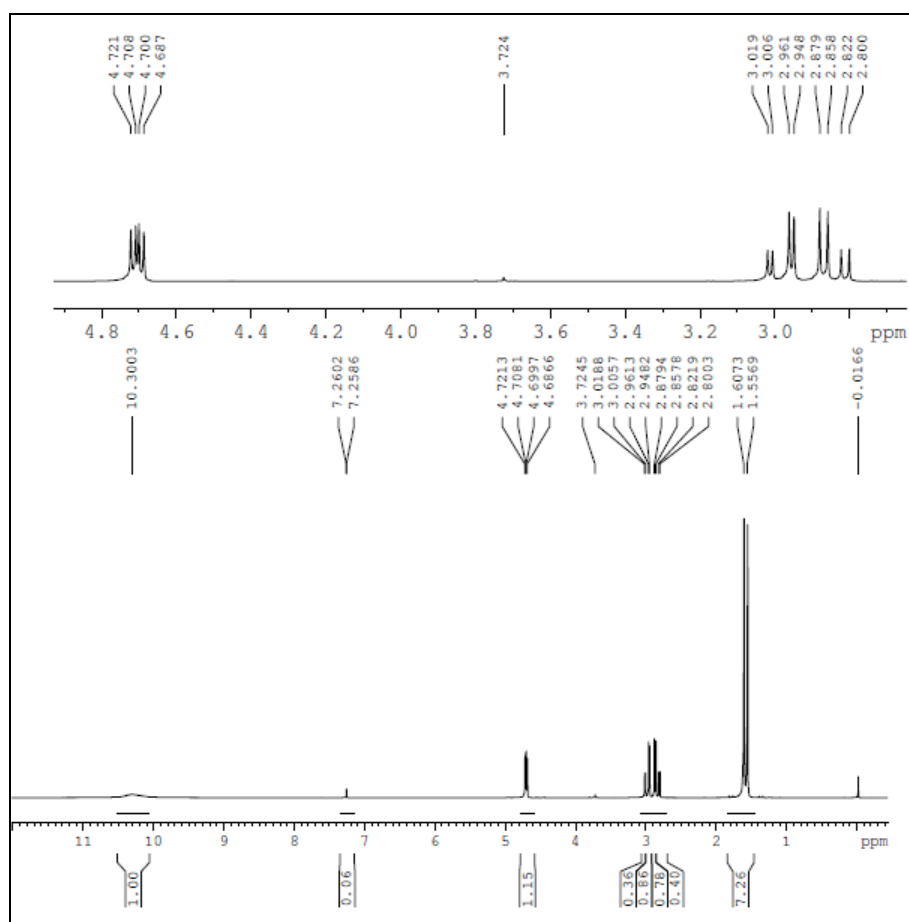
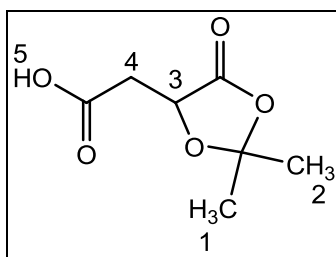
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SÍNTESE

#### 4.1.1 Síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético (ácido málico protegido) (GREEN, KIDDLE, THOMPSON, 1995; GIAROLLA, 2007)

A estrutura do ácido L(-)-málico é composta por dois ácidos carboxílicos livres, o que poderia dificultar a síntese dos dendrímeros, resultando em reações cruzadas e dificultando, também, o processo de identificação e purificação dos compostos obtidos. Dessa maneira, para promover seletividade nas reações dos intermediários envolvidos na construção dos pró-fármacos dendriméricos, Giarolla (2007) estabeleceu as condições reacionais para a proteção de um dos ácidos carboxílicos por meio de uma lactona, de modo que o outro grupo ficasse livre para reagir, obtendo-se o ácido málico protegido.

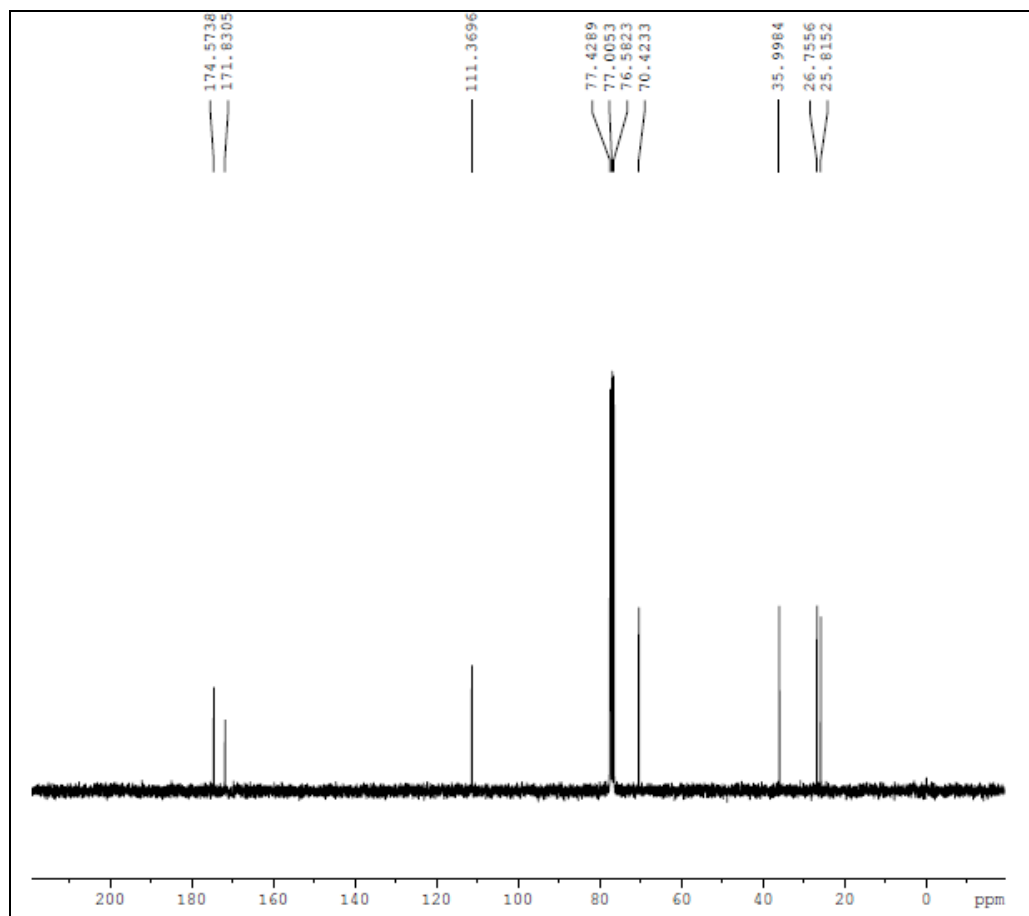
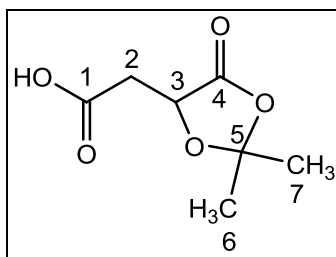
Os resultados de RMN obtidos para o produto final foram semelhantes aos descritos por Green e colaboradores (1995) e por Giarolla (2007). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 1), apresentou dois singletos em 1,55 ppm e 1,60 ppm, que correspondem aos hidrogênios dos grupos metila da lactona do ácido málico protegido ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ). Em adição, o RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 2) apresentou sinais dos carbonos das metilas da lactona em 25,81 ppm e 26,75 ppm ( $\text{C}_6$  e  $\text{C}_7$ ) e um sinal em 35,99 ppm, relativo ao carbono  $\text{C}_5$ . A presença destes sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  indica que o ácido málico protegido foi obtido. O produto final apresentou-se como cristais aciculares de coloração branca e o rendimento médio foi de 60%.



**Espectro 1. RMN  $^1\text{H}$  do ácido málico protegido.**

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), 300 MHz,  $\delta$  = ppm**

7,26 ( $\text{CDCl}_3$ ); 1,55, 1,60 (s, 6H,  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$ ); 2,91 (ddd, 2H,  $\text{H}_4$ ,  $J=3,9$  Hz,  $J=17,25$ ,  $J=6,6$  Hz,  $J=17,25$  Hz); 4,70 (dd, 1H,  $\text{H}_3$ ,  $J=6,3$  Hz,  $J=3,9$  Hz); 10,30 (s, 1H,  $\text{H}_5$ )



**Espectro 2.** RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido málico protegido.

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), 75 MHz,  $\delta = \text{ppm}$**

77,00 ( $\text{CDCl}_3$ ); 25,81 ( $\text{C}_6$ ); 26,75 ( $\text{C}_7$ ); 35,99 ( $\text{C}_2$ ); 70,42 ( $\text{C}_5$ ); 111,36 ( $\text{C}_3$ );

171,83 ( $\text{C}_1$ ); 174,57 ( $\text{C}_4$ )

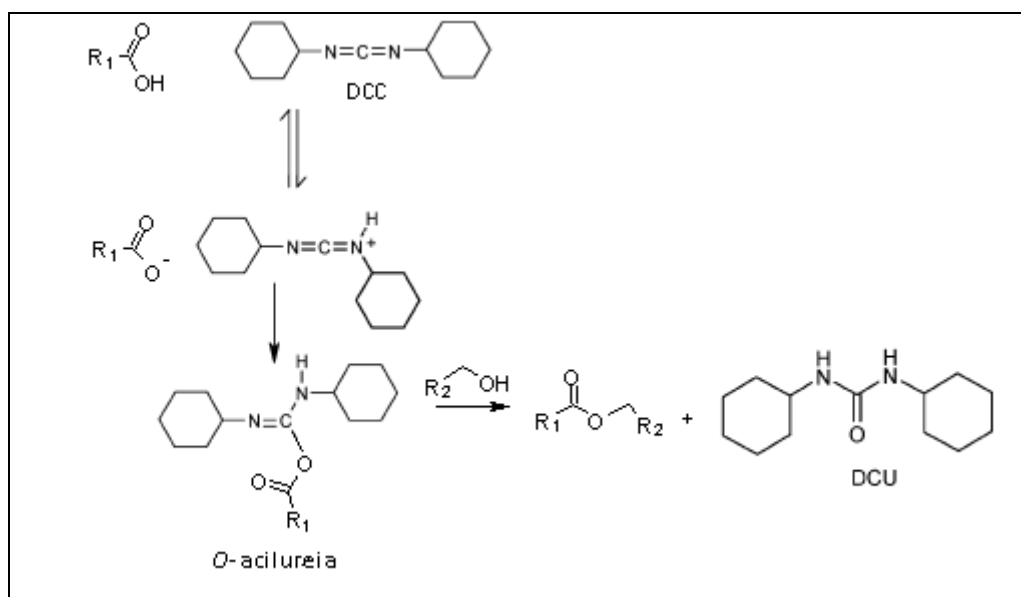
## 4.1.2 Síntese dos pró-fármacos dendriméricos

### 4.1.2.1 Síntese do intermediário IA – *mio*-inositol como foco central

➤ Método A: métodos utilizando DCC como agente condensante

Em todas as variações realizadas para o método A (experimentos A1, A2, A3 e A4), a dicicloexilcarbodiimida (DCC) foi o agente condensante de escolha. A utilização desta carbodiimida tem sido de grande relevância nos últimos 50 anos. Sua moderada atividade e o custo relativamente baixo tornaram esse reagente popular na síntese de amidas, ésteres e anidridos ácidos (SHEEHAN, HESS, 1955; PRASAD, BHARANTHI, HASEENA, 2011; JOULLIÉ, LASSEN, 2010).

O primeiro passo das reações de acoplamento que utilizam DCC é a adição do ácido carboxílico à carbodiimida, normalmente em proporção equimolar, resultando na formação de uma *O*-aciluréia, um poderoso agente acilante. Após a sua formação, este intermediário sofre ataque nucleofílico do par de elétrons do oxigênio do álcool, levando à formação do éster desejado e de um produto secundário inativo, a *N,N'*-dicicloexilureia (DCU) (Figura 39). Por ser insolúvel em diversos solventes orgânicos como diclorometano, clorofórmio, éter etílico e piridina, a formação desse produto secundário pode ser caracterizada por um precipitado no meio reacional, o que permite sua remoção por filtração simples (SANTOS, 2009; JOULLIÉ, LASSEN, 2010). Entretanto, sabe-se que a precipitação do DCU durante a reação pode ocorrer de maneira incompleta, dificultando a purificação do produto final (JOULLIÉ, LASSEN, 2010).



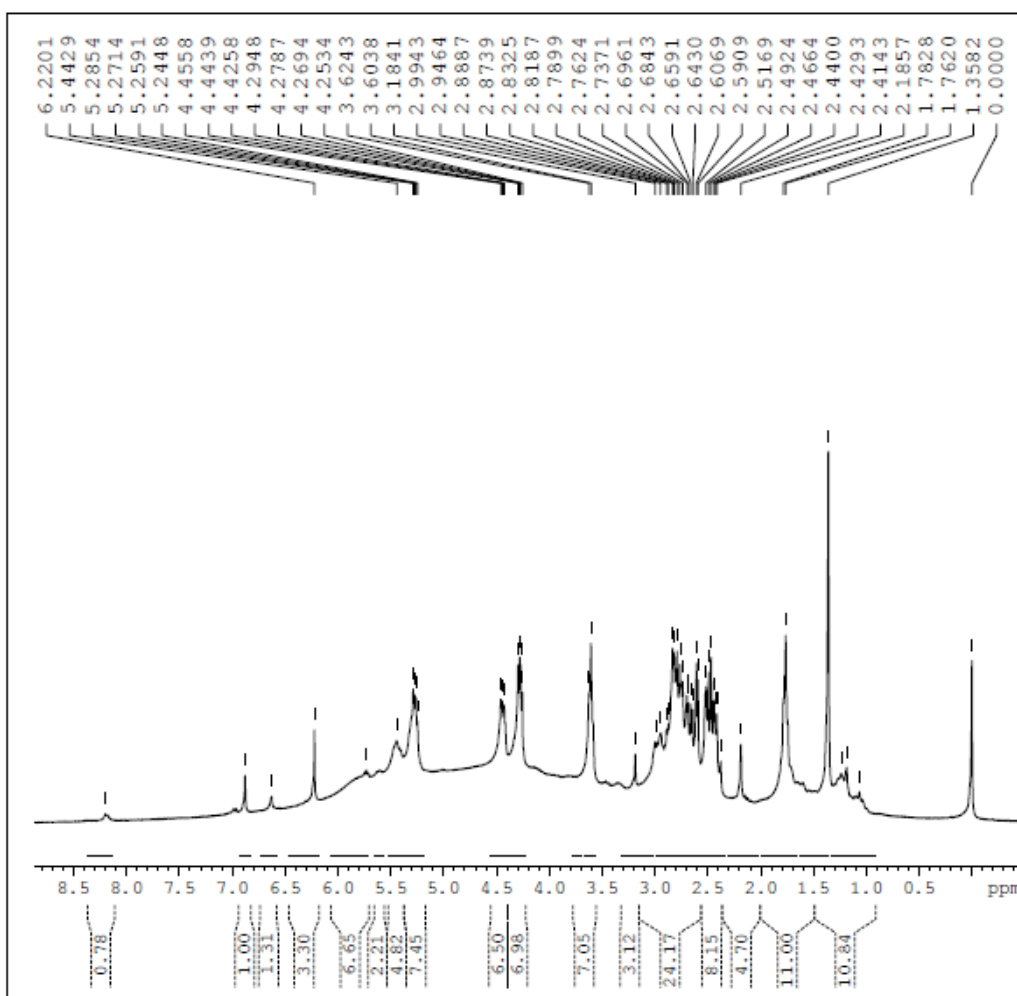
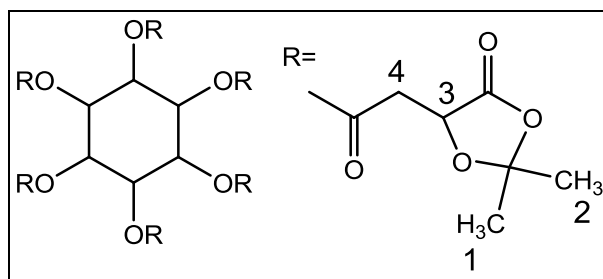
**Figura 39.** Mecanismo de esterificação utilizando DCC (VALEUR, BRADLEY, 2009).

- Experimento A1 (adaptado de DAMEN et al., 2000)

No experimento A1 a proporção molar utilizada entre o álcool (*mio*-inositol) e o ácido (ácido málico protegido) foi de 1:6, objetivando o maior número de substituições possível do espaçante ao foco central do dendrímero.

Após 8 horas de reação, as placas de cromatografia em camada delgada com fase móvel clorofórmio/metano 2:1 (v/v) apresentaram duas manchas. A primeira com *R<sub>f</sub>* de 0,57, relacionada ao produto secundário da reação (DCU), e a segunda, com *R<sub>f</sub>* de 0,92, que pode estar relacionada ao intermediário desejado (intermediário IA).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Espectro 3) mostrou excesso de sinais, provavelmente relacionados ao produto secundário da reação (DCU), que dificultam a sua interpretação. Dessa maneira, não foi possível observar com clareza os sinais correspondentes ao intermediário desejado, tampouco dos materiais de partida utilizados. Portanto, esse experimento foi inconclusivo.



**Espectro 3.** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) da reação de esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido utilizando DCC (experimento A1).

➤ Experimento A2 (adaptado de DELONG et al., 2007)

No experimento A2, a proporção molar utilizada entre ácido málico protegido e o *mio*-inositol foi de 1:1,5, respectivamente, seguindo o protocolo da referência utilizada.

Após 26 horas de reação, as placas de cromatografia em camada delgada com fase móvel hexano acetato de etila 2:1 (v/v) mostraram a formação de duas manchas com *R<sub>f</sub>* de 0,50 e 0,79. A mancha com *R<sub>f</sub>* de 0,50 pode estar relacionada ao DCU, enquanto que a mancha mais apolar, com *R<sub>f</sub>* de 0,79, pode indicar a formação do intermediário IA.

O RMN de <sup>1</sup>H (Espectro 4) apresentou sinais referentes aos hidrogênios do ácido málico protegido em 1,63 e 1,65 ppm (H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>), entre 2,92 e 3,08 ppm (H<sub>3</sub>) e entre 4,71 e 4,80 ppm (H<sub>3</sub>). Em adição, os sinais entre 3,09 e 4,14 ppm podem estar relacionados ao hidrogênios do anel do *mio*-inositol, o que indica a formação do produto desejado. Apesar dos indícios da obtenção do produto, o RMN de <sup>1</sup>H apresenta excesso de impurezas na região entre 1 e 2 ppm, relacionadas ao produto secundário da reação (DCU).

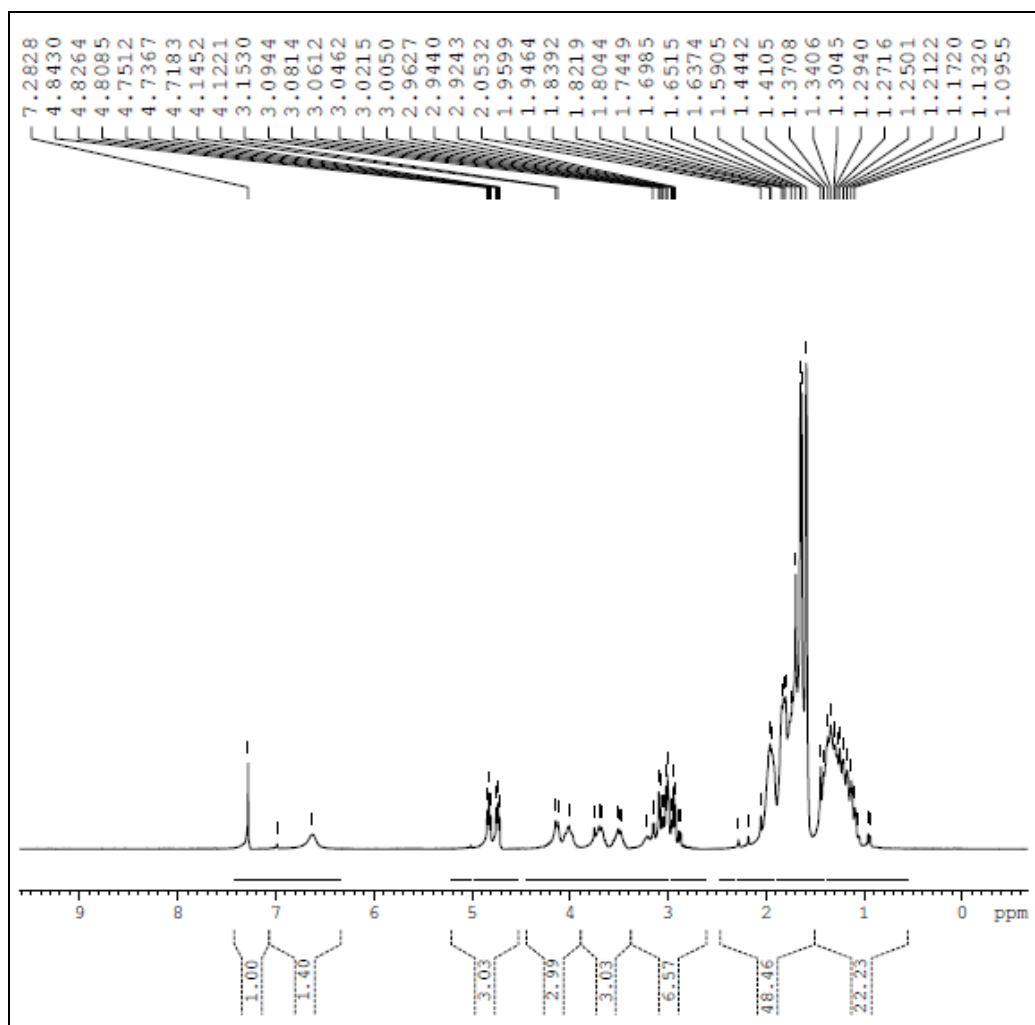
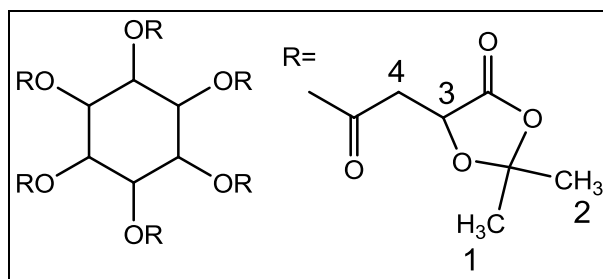
Como houve indícios da obtenção do intermediário IA por esse experimento, realizou-se purificação por coluna cromatográfica (coluna 1) do produto. O eluente foi adicionado em gradiente de concentração, seguindo as proporções de 3:17, 6:14, 9:11, 12:8 e 15:5 de hexano/acetato de etila (v/v), respectivamente. Ao término da coluna, a fração de interesse com *R<sub>f</sub>* de 0,79 foi isolada.

O RMN de <sup>1</sup>H da fração isolada pela coluna 1 (Espectro 5) mostrou sinais referentes ao ácido málico protegido em 1,51 e 1,62 ppm (H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>), entre 2,72 e 2,88 ppm (H<sub>4</sub>) e em entre 4,63 e 4,65 ppm (H<sub>3</sub>). Em adição, sinais dos hidrogênios do anel do *mio*-inositol possivelmente estão entre 3,56 e 4,61 ppm. Para o RMN de <sup>13</sup>C (Espectro 6), os sinais do ácido málico protegido estão em 25 e 26 ppm (C<sub>6</sub> e C<sub>7</sub>), 35,9 ppm (C<sub>5</sub>), 70,57 ppm (C<sub>2</sub>), 111 ppm (C<sub>3</sub>) 171 ppm (C<sub>1</sub>) e 172 ppm (C<sub>4</sub>) e o sinais do *mio*-inositol estão entre 70 e 71 ppm (carbonos do anel). No entanto, mesmo após a coluna cromatográfica, os sinais do DCU permaneceram no produto e são visíveis tanto no espectro de <sup>1</sup>H como o de <sup>13</sup>C, nas regiões entre 1 e 2 ppm e 20 a 40 ppm,

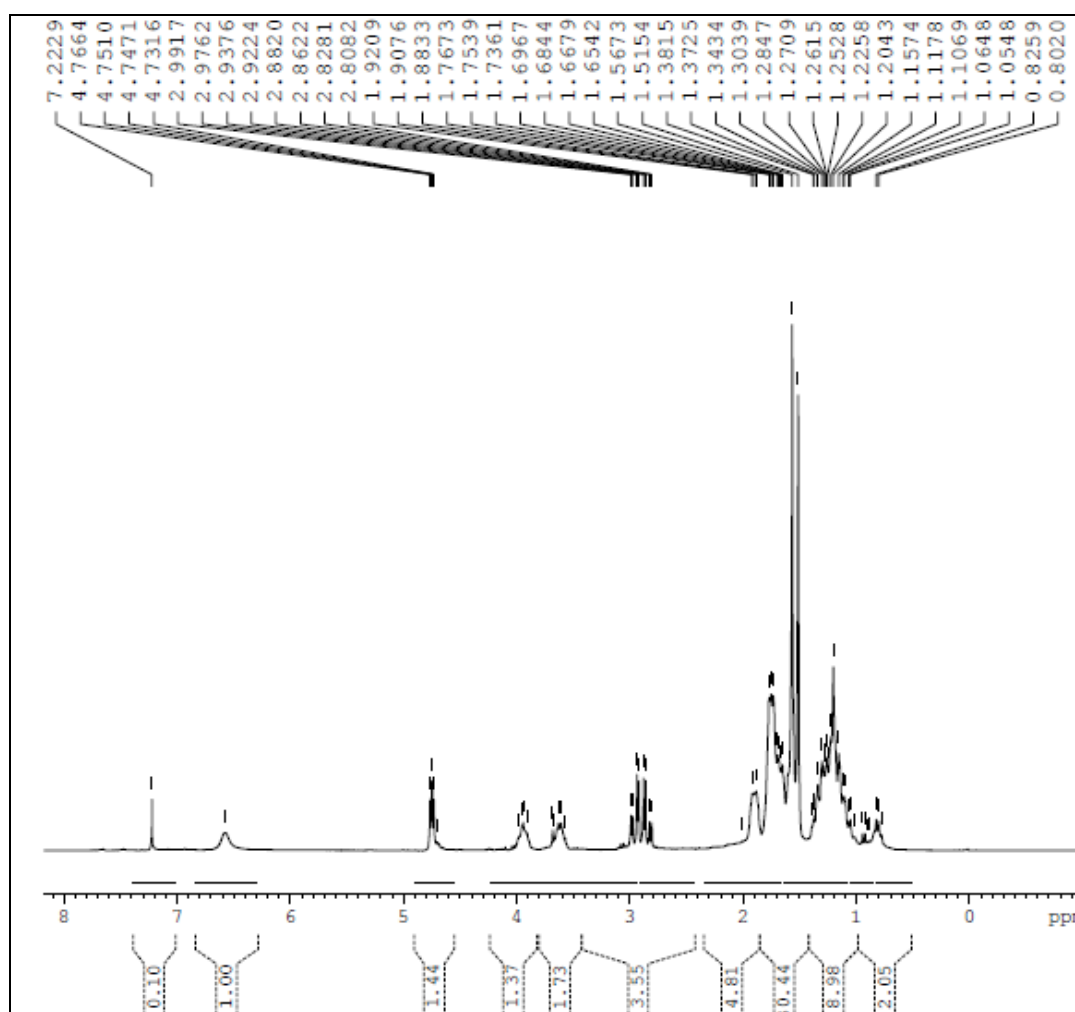
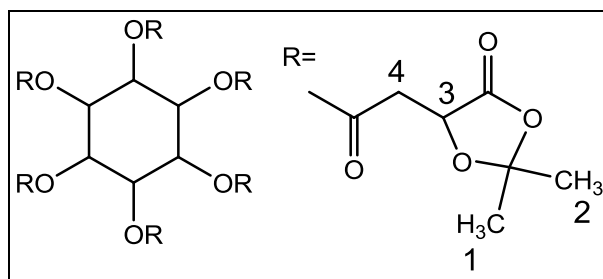


respectivamente. Estes resultados mostram que o produto não foi purificado com sucesso.

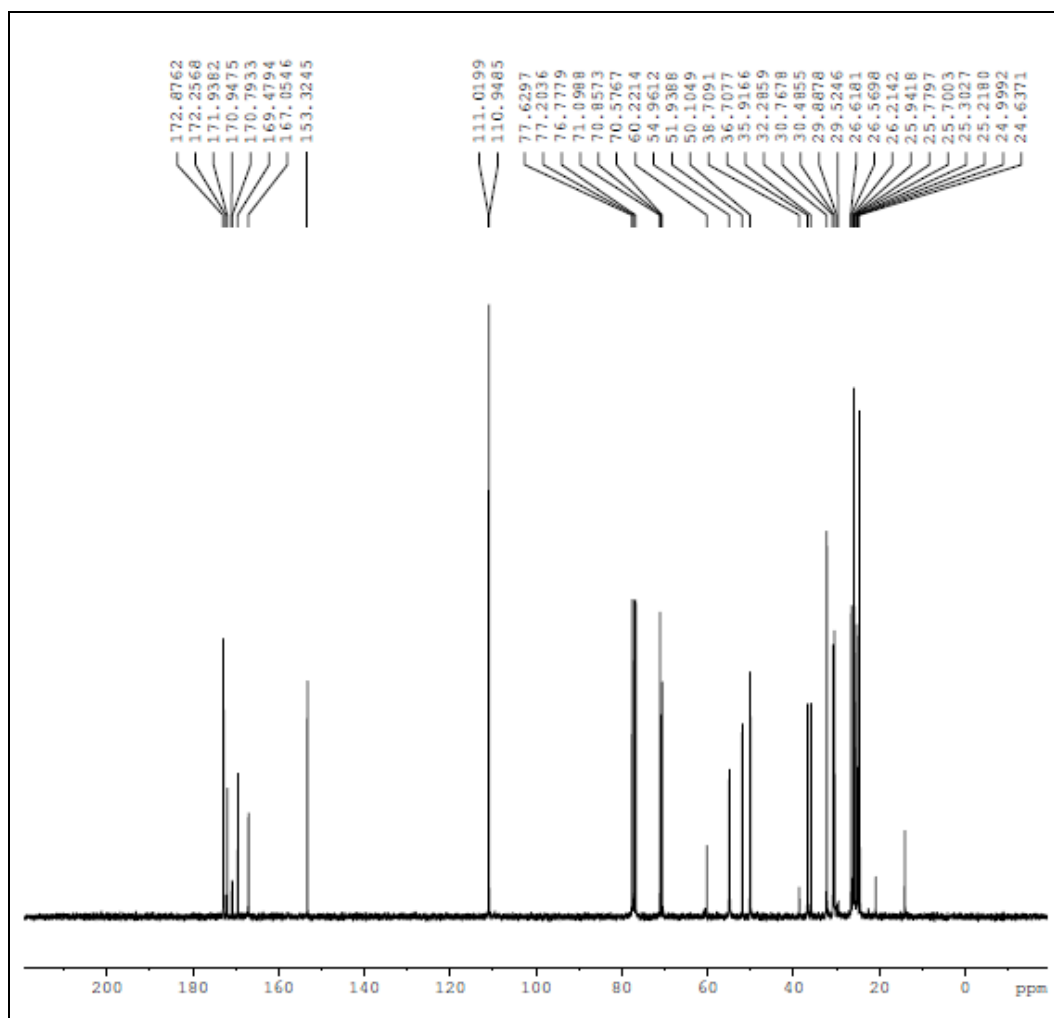
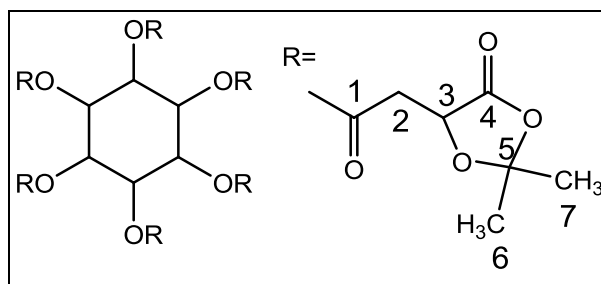
Com o objetivo de remover totalmente o DCU da amostra, partiu-se da fração isolada da coluna 1 e realizou-se nova coluna cromatográfica (coluna 2), também em gradiente de concentração, seguindo as proporções de 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 e 0:10 de hexano/acetato de etila (v/v), respectivamente. Após a coleta da fração de interesse ( $R_f$  0,79), o espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 7) ainda apresentava sinais do DCU entre 1 e 2 ppm, além dos sinais do intermediário IA, já discutidos anteriormente. Portanto, as colunas cromatográficas não foram eficientes na purificação do composto de interesse.



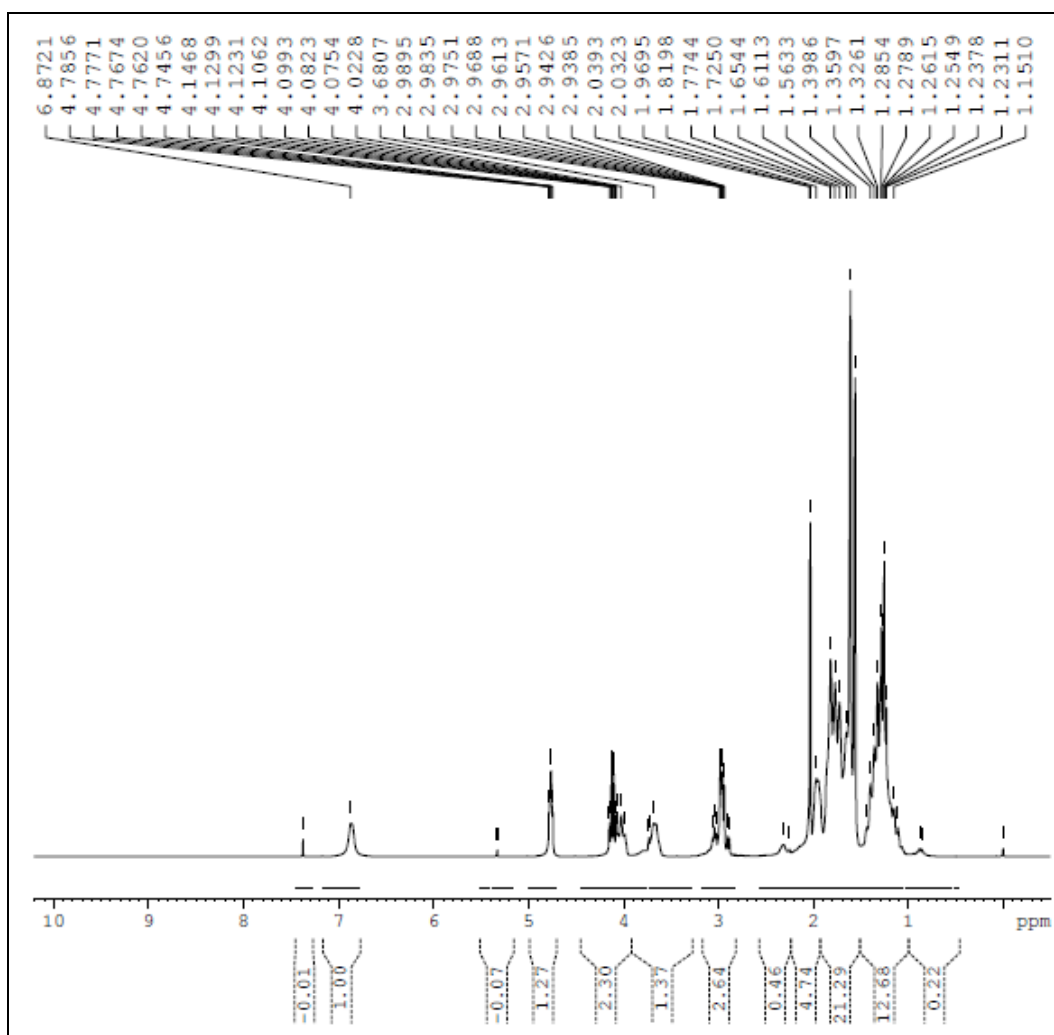
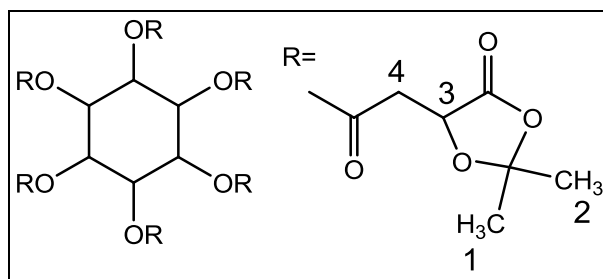
**Espectro 4.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido utilizando DCC (método A2).



**Espectro 5.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da coluna 1 do produto da esterificação entre *myo*-inositol e ácido málico protegido utilizando DCC (método A2).



**Espectro 6.** RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da coluna 1 do produto da esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido utilizando DCC (método A2).



**Espectro 7.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da coluna 2 do produto da esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido utilizando DCC (método A2).

- Experimento A3 (adaptado de DELONG et al., 2007)

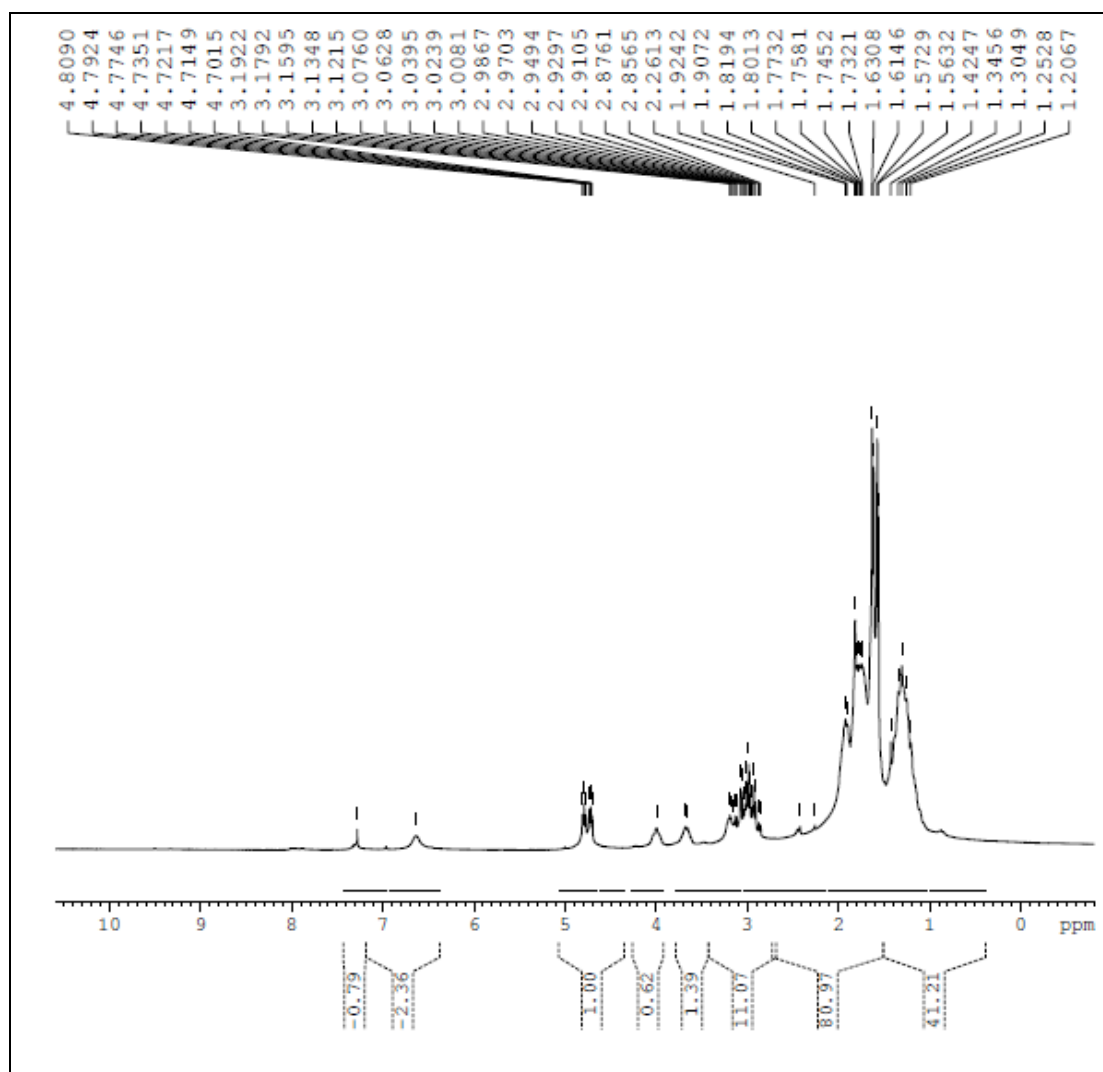
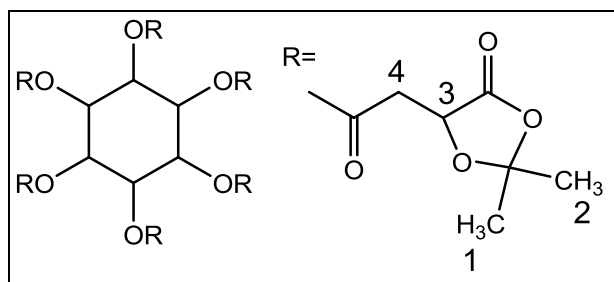
Como houve indícios da obtenção do intermediário IA pelo experimento A2 e as colunas cromatográficas não foram eficientes na purificação do composto, o objetivo do experimento A3 foi repetir o procedimento de síntese realizado no experimento anterior (A2), contudo, utilizando outro método para purificação do produto obtido.

Ao término da reação, a placa de cromatografia em camada delgada com fase móvel hexano/acetato de etila 2:1 (v/v) mostrou o mesmo comportamento do produto obtido no experimento A2, sendo duas manchas distintas com  $R_f$  de 0,50 (DCU) e  $R_f$  0,79 (intermediário IA).

Como discutido anteriormente, apesar do DCU ser insolúvel em diversos solventes orgânicos, a sua precipitação no meio reacional pode ocorrer de maneira incompleta, dificultando a purificação de produtos obtidos quando se utiliza DCC como agente condensante (JOUILLIÉ, LASSEN, 2010). Dessa maneira, para forçar a precipitação do DCU no produto final, utilizou-se diclorometano e baixa temperatura (congelador), como técnica de purificação para esse método.

Após o tratamento da reação e remoção do acetato de etila por pressão reduzida, adicionou-se diclorometano (quantidade suficiente para solubilizar o produto) e a amostra foi armazenada em congelador. Após 24 horas, a amostra foi filtrada (filtração simples) para remover DCU precipitado e, em seguida, adicionou-se mais diclorometano à amostra, que foi armazenada novamente em congelador. Esse procedimento foi realizado por cinco dias, até que não houvesse mais DCU precipitado no diclorometano.

O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 8) do produto, após o procedimento descrito anteriormente, apresentou sinais indicativos da obtenção do intermediário IA já citados anteriormente para o experimento A2. No entanto, a técnica utilizada para precipitar o excesso de DCU da amostra não foi eficiente. Nota-se, entre 1 e 2 ppm, que os sinais relativos ao produto secundário permaneceram na amostra. Portanto, assim como a coluna cromatográfica, essa técnica não foi eficiente na purificação do composto desejado.



**Espectro 8.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da produto da esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido após o procedimento de purificação (experimento A3).

- Experimento A4 (adaptado de NEISES, STEGLICH, 1985)

Frente à dificuldade de purificação encontrada para os produtos anteriores, o objetivo do experimento A4 foi solucionar o problema de purificação dos compostos obtidos com a utilização de DCC como agente de acoplamento. Para esse método, a fase orgânica foi filtrada sob pressão reduzida a cada etapa da extração, com a finalidade de remover o excesso de DCU formado durante a reação.

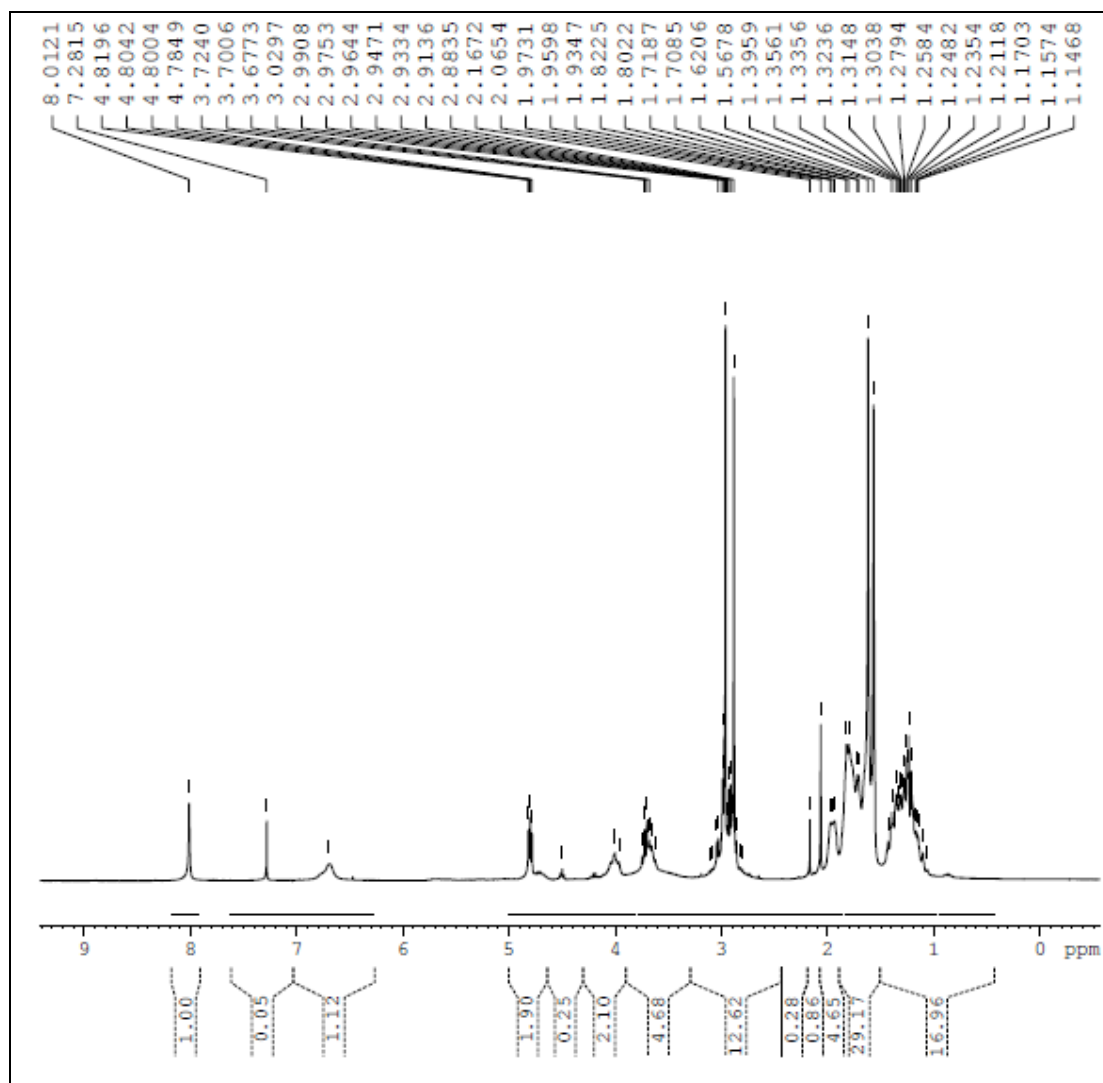
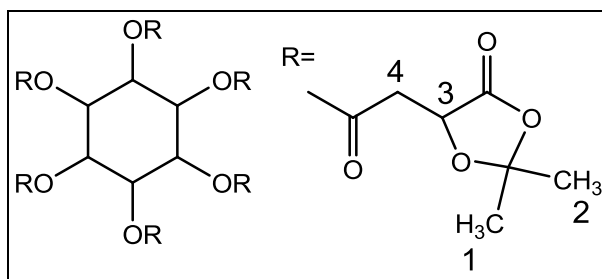
A proporção molar entre ácido málico protegido e o *mio*-inositol foi de 1:3, de acordo com a referência utilizada. Após 24 horas de reação, a cromatografia de camada delgada com fase móvel hexano/acetato de etila 2:1 (v/v) indicou a formação de duas manchas distintas. A primeira, com  $R_f$  de 0,52, pode estar relacionada a DCU, enquanto que a segunda mancha, com  $R_f$  0,82, pode corresponder ao intermediário IA.

A técnica para purificação do produto obtido foi semelhante à descrita para o método A3, entretanto utilizou-se éter etílico em substituição ao diclorometano. Esse procedimento foi realizado duas vezes, até que não houvesse mais precipitação de DCU na amostra.

Após o procedimento de purificação, o RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 9) apresentou sinais correspondentes aos hidrogênios  $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$  em 1,56 e 1,62 ppm, entre 2,86 ppm e 3,03 ppm relativos ao hidrogênios  $\text{H}_4$ , e entre 4,78 e 4,82 ppm, relacionados ao hidrogênios  $\text{H}_3$ . Em adição, os sinais entre 3,96 e 4,08 ppm podem representar os hidrogênios do anel do *mio*-inositol, indicando a formação do produto desejado. No entanto, os sinais entre 1 e 2 ppm indicam que o produto secundário, DCU, permanece na amostra.

Os resultados obtidos pelo método A demonstram a dificuldade de purificar os produtos sintetizados com DCC como agente condensante. Por esta razão, optou-se por buscar métodos alternativos que gerassem reações mais limpas e de fácil purificação para a obtenção do intermediário IA.





**Espectro 9.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido utilizando DCC (método A4).

- Método B: método do anidrido misto utilizando 4-nitrofenilcloroformato (adaptado de VARGAS, 2007)

O método B foi realizado com o objetivo de obter o intermediário IA utilizando um reagente que levasse à obtenção do produto com menos impurezas e de fácil purificação em relação ao método com DCC. Com essa finalidade, optou-se por utilizar o 4-nitrofenilcloroformato. A função desse reagente é formar um anidrido misto com o ácido carboxílico da reação, que por sua vez, pode reagir rapidamente com um nucleófilo, como um álcool, levando à formação do éster desejado. O anidrido misto tem como característica possuir reatividades diferentes entre suas carbonilas, como pode ser observado pelo mecanismo de reação (Figura 37). A carbonila **a** é mais eletrofílica, ou seja, mais reativa, em relação à carbonila **b**, o que leva à maior seletividade de reação e, conseqüentemente, à obtenção de produtos com menos impurezas (MONTALBELLI, FALQUE, 2005).

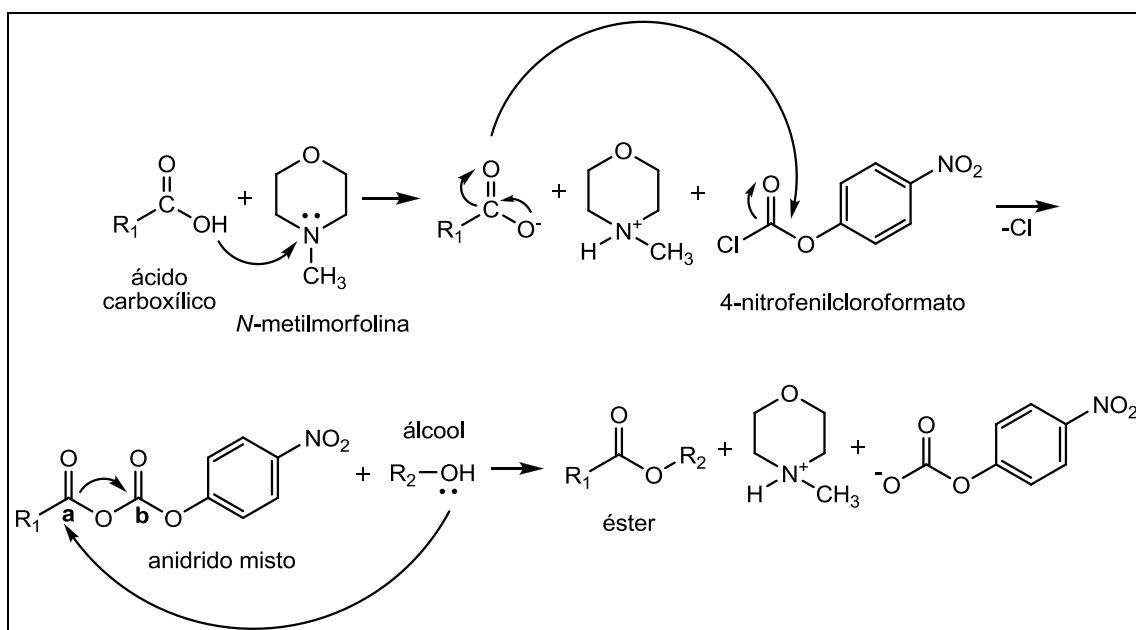
A proporção molar utilizada para esse método foi de 1:6 (álcool:ácido), com o objetivo de se obter o maior número de substituições ao foco central. Após 24 horas de reação, as placas de cromatografia em camada delgada com fase móvel clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) mostraram a formação de duas manchas diferentes do material de partida. O ácido málico protegido possui  $R_f$  de 0,23, enquanto que os demais produtos da reação apresentaram valores de  $R_f$  de 0,46 e 0,61.

O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 10) mostrou a formação do anidrido misto entre o ácido málico protegido e o 4-nitrofenilcloroformato. Conforme explicado anteriormente, a formação desse anidrido misto faz parte do mecanismo de reação desse agente condensante e este deveria ter sofrido ataque nucleofílico do *mio*-inositol para a formação do intermediário desejado, o que não ocorreu (Figura 40). Os sinais que evidenciam a formação desse composto podem ser observados entre 7,29 e 8,34 ppm, correspondentes ao anel nitrado do agente condensante, além dos sinais do ácido málico protegido em 1,60 e 1,64 ppm ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ), sinais em campo mais baixo, mas característicos do ácido málico protegido na região entre 3,08 e 3,26 ppm ( $\text{H}_4$ ) e entre 4,81 e 4,84 ppm ( $\text{H}_3$ ).

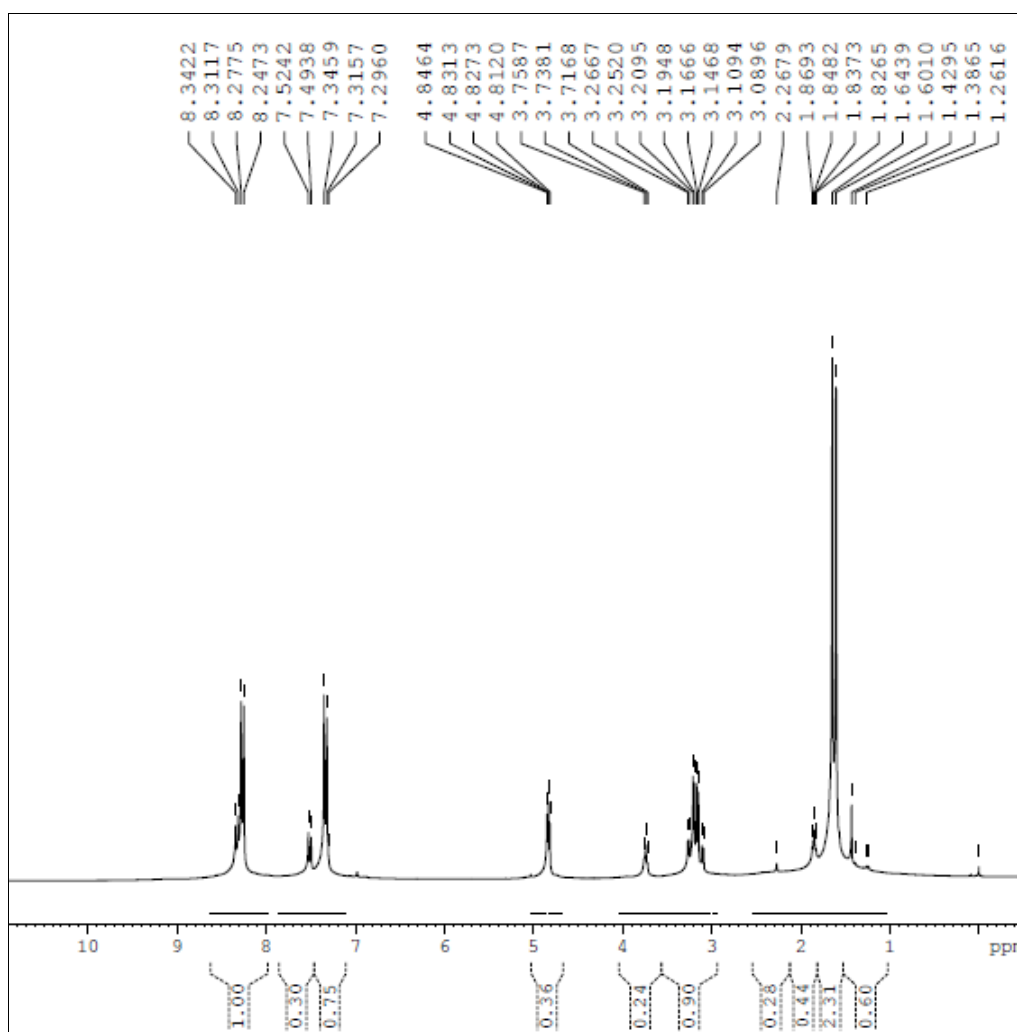
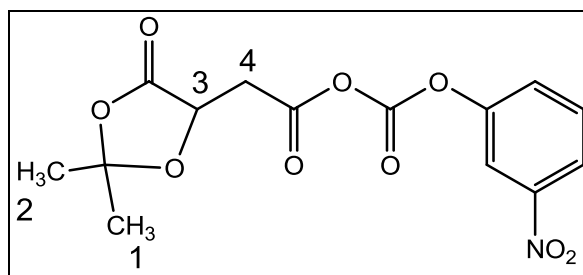
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 11) confirma a obtenção do anidrido misto, pelos sinais entre 121,69 e 125,48 ppm, que correspondem aos

carbonos do anel nitrofenila. Em adição, o sinal em 154,89 ppm refere-se ao carbono do anel ligado ao oxigênio e o sinal em 145,54 ppm está relacionado à carbonila do anidrido. Os sinais do ácido málico protegido podem ser observados na região de 25 ppm (C<sub>6</sub> e C<sub>7</sub>), 111,51 ppm (C<sub>5</sub>) e 36,23 ppm (C<sub>3</sub>), 70,34 ppm (C<sub>2</sub>) e em 171,55 ppm, que corresponde à carbonila da lactona. O sinal em 166,87 refere-se à carbonila (C<sub>1</sub>) do anidrido.

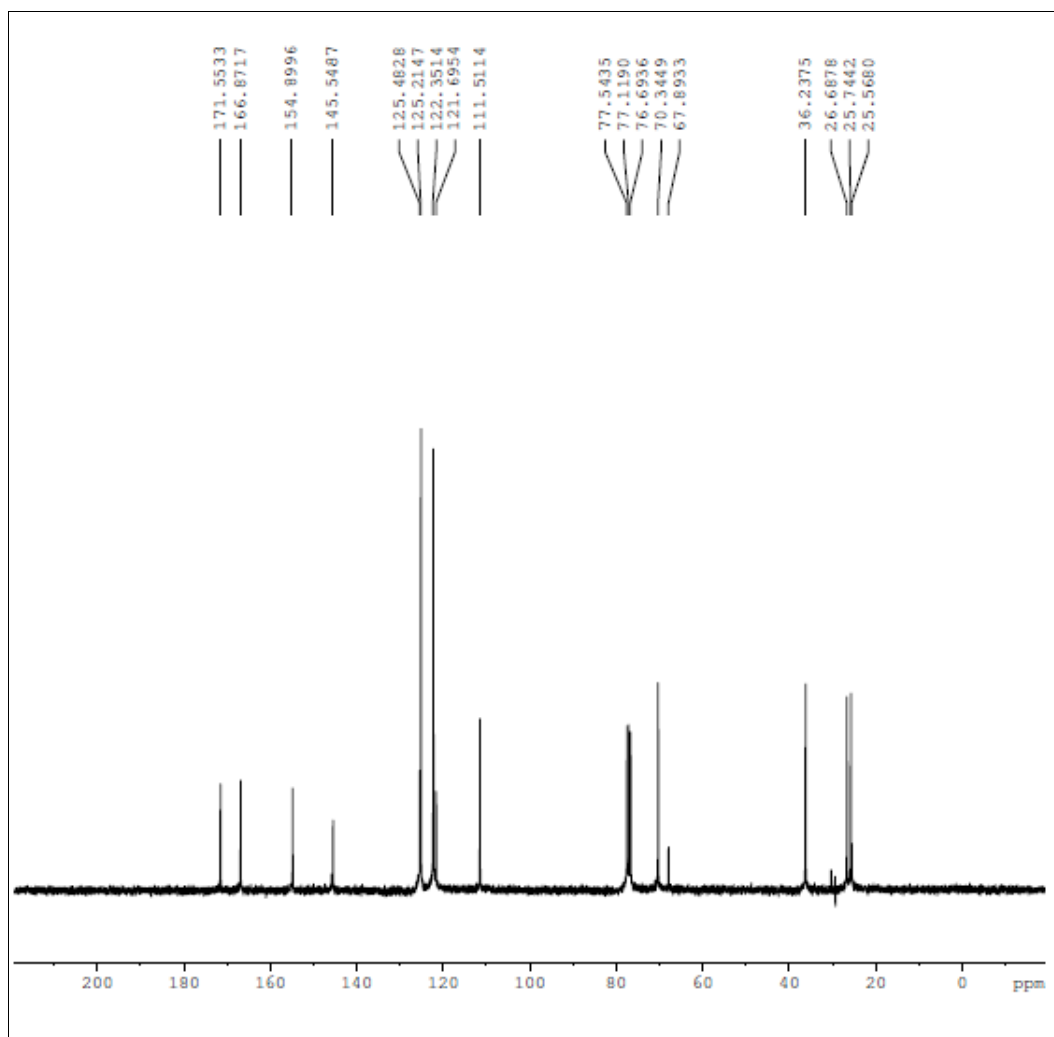
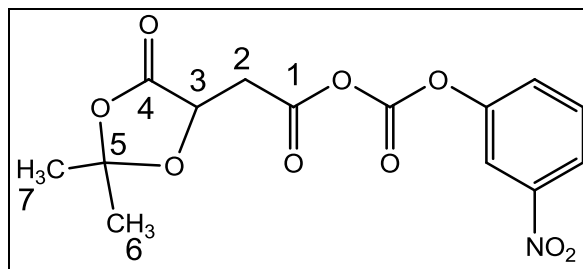
Os resultados obtidos pelo RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C indicam que o *mio*-inositol não é um bom nucleófilo para esse tipo de reação. Corroborando esse resultado, métodos semelhantes também utilizando ácido málico protegido e *mio*-inositol foram realizados pelo grupo de dendrímeros do LAPEN, utilizando cloroformato de etila e cloroformato de metila. Entretanto, os resultados obtidos foram análogos aos observados com o 4-nitrofenilcloroformato, pois também levaram à obtenção do anidrido misto estável (SANTOS, 2012). Portanto, o método do anidrido misto não foi eficiente na obtenção do intermediário IA.



**Figura 40.** Mecanismo de reação do 4-nitrofenilcloroformato (adaptado de GIAROLLA, 2012).



**Espectro 10.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido utilizando 4-nitrofenilclorofornato (método B).

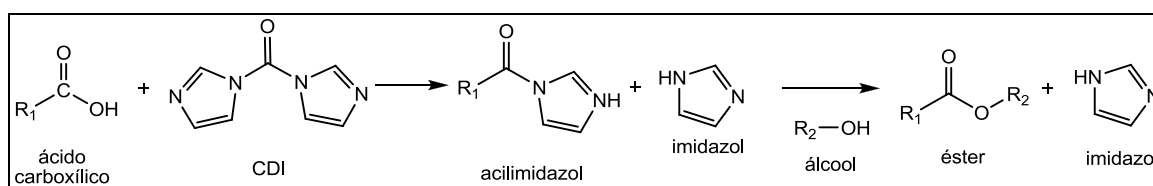


**Espectro 11.** RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido utilizando 4-nitrofenilcloroformato (método B).

➤ Método C: métodos utilizando CDI como agente condensante

Como os métodos que utilizaram DCC resultaram em produtos de difícil purificação e o método do anidrido misto não foi eficiente na síntese do intermediário IA, optou-se pela busca de outro agente condensante, que levasse à obtenção do intermediário IA, com menos problemas na purificação. Para esse método, o carbonildiimidazol, um reagente imidazólico conhecido como CDI, foi o agente acoplante de escolha. O CDI foi sintetizado em 1958, durante a busca por melhores agentes condensantes em relação ao DCC (ANDERSON, PAUL, 1958; HAN, KIM, 2004). Esse reagente é frequentemente utilizado em síntese de peptídeos, ésteres e tioésteres (MONTALBETTI, FALQUE, 2005).

O mecanismo de reação do CDI (Figura 41) envolve a formação de um intermediário de síntese reativo, o acilimidazol, que, ao sofrer ataque nucleofílico de um álcool, leva à formação do éster desejado. O produto secundário dessa síntese é o imidazol, que apresenta boa solubilidade em água, o que pode facilitar a purificação dos produtos obtidos por esse método em relação aos obtidos com DCC. Outra vantagem é que a formação *in situ* de imidazol pode dispensar do uso de base durante o processo sintético (MONTALBETTI, FALQUE, 2005).



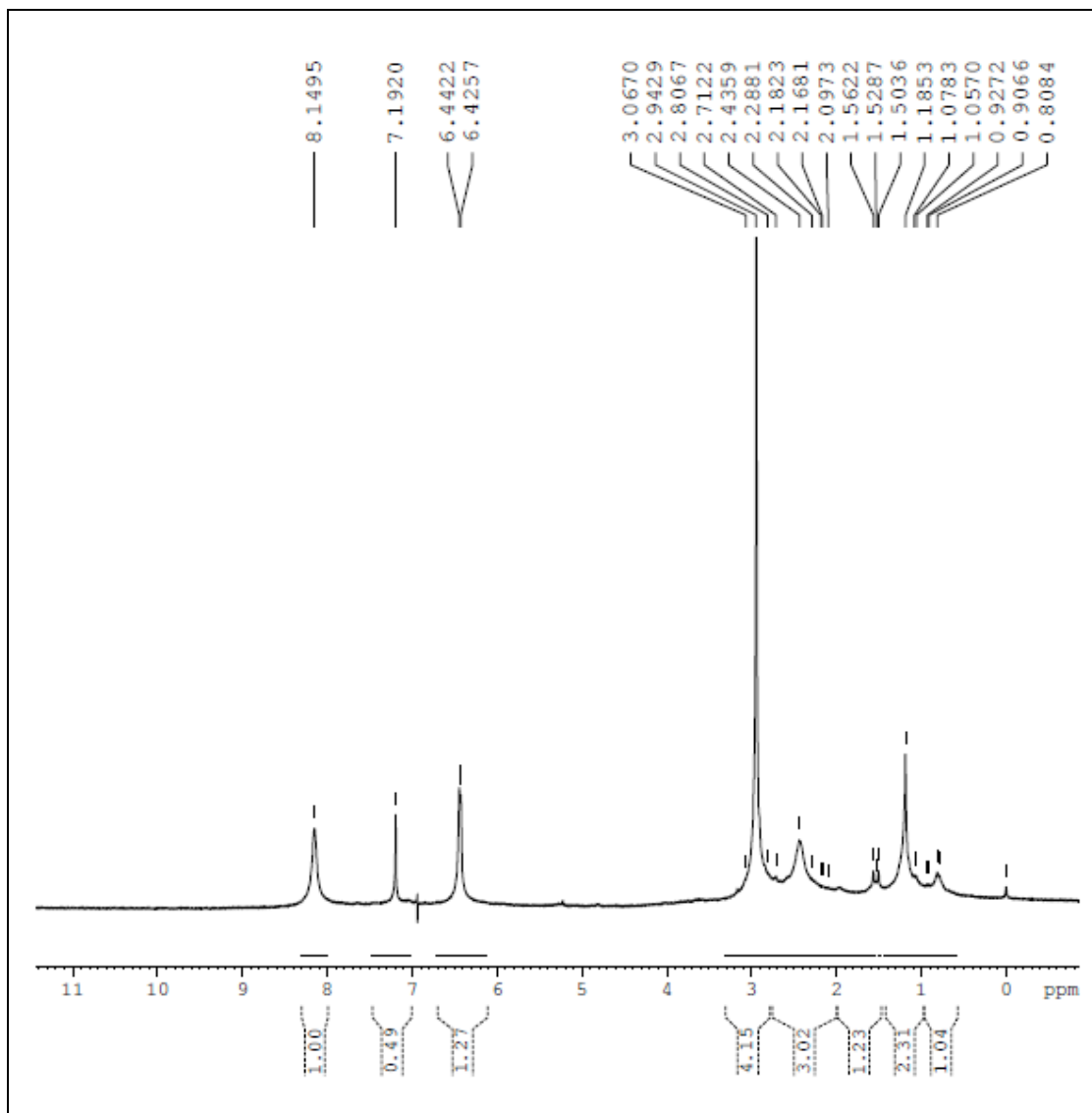
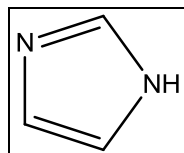
**Figura 41.** Mecanismo de reação do carbonildiimidazol (CDI) (CHRISTIE, 1993).

- Experimento C1 (adaptado de ABOUSSAFY et al., 2010)

O experimento C1 utilizou a proporção molar entre *mio*-inositol e ácido málico protegido de 1:6, respectivamente. A utilização dessa proporção teve como objetivo obter o máximo de substituições possíveis do espaçante ao foco central.

Após 24 horas de reação, a placa de cromatografia em camada delgada com fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v) mostrou a formação de duas manchas com valores de  $R_f$  distintos. A primeira, com  $R_f$  de 0,54, pode estar relacionada ao produto secundário formado na reação (imidazol) e a segunda mancha, mais apolar e com  $R_f$  de 0,90, está, possivelmente, relacionada ao intermediário IA.

Apesar da placa de cromatografia em camada delgada apresentar indícios da formação do produto, o RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 12) não apresenta os sinais correspondentes ao intermediário de interesse. O espectro do produto obtido apresenta sinais na região entre 6,42 e 8,14 ppm, que podem estar relacionados aos hidrogênios do imidazol, e sinais em 2,94 e 2,08 ppm, correspondentes ao solvente utilizado na reação (DMF). Os sinais característicos do ácido málico protegido discutidos nos métodos anteriores bem como os sinais do *mio*-inositol estão ausentes neste espectro. Portanto, este método não foi eficiente na obtenção do intermerdiário IA.



**Espectro 12.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido utilizando CDI (experimento C1).

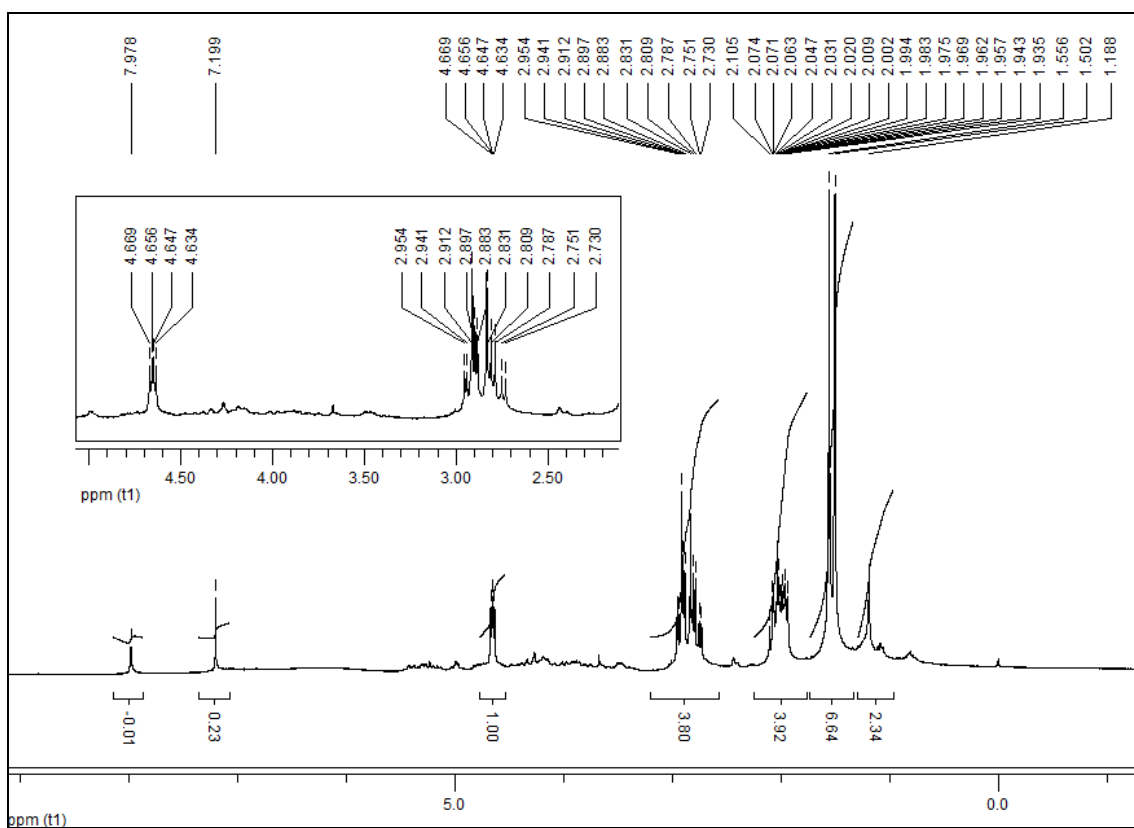
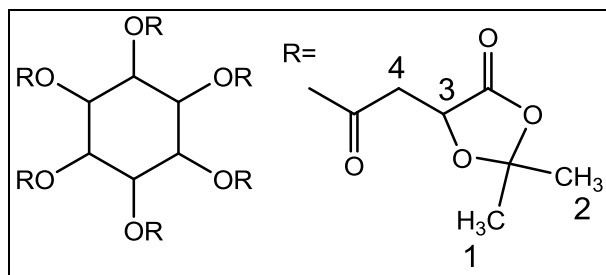


- Experimento C2 (adaptado de BODE et al., 2010)

Para o experimento C2, utilizou-se excesso de agente condensante, objetivando deslocar a reação para a formação do intermediário reativo (acilimidazol). Além disso, utilizou-se, também, *mio*-inositol em proporção equimolar ao ácido málico protegido, com o intuito de facilitar o ataque nucleofílico do álcool ao acilimidazol, favorecendo a formação do intermediário IA. Dessa maneira, as proporções molares utilizadas foram de 1:1:1,50 de ácido málico protegido, *mio*-inositol e CDI, respectivamente.

Após o período de 3 horas de reação, a placa de cromatografia em camada delgada com fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v) mostrou a formação de duas manchas diferentes em relação ao material de partida com valores de  $R_f$  de 0,78 e 0,93. A mancha mais apolar ( $R_f$  0,93) pode estar relacionada ao intermediário IA.

Apesar de o RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 13) apresentar sinais relativos ao ácido málico protegido em 1,55 e 1,50 ppm ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ), entre 4,63 e 4,66 ppm ( $\text{H}_3$ ) e na região entre 2,73 e 2,95 ( $\text{H}_4$ ) (com exceção aos sinais em 2,91 e 2,83 ppm, que correspondem ao resíduo de DMF, solvente utilizado na reação) e os sinais em 7,19 e 7,97 ppm, que sugerem a presença do produto secundário da reação (imidazol), os sinais do *mio*-inositol estão ausentes, como pode ser observado pela área ampliada no espectro. Dessa maneira, assim como o experimento anterior, o experimento C2 não foi eficiente para a síntese do intermediário IA.



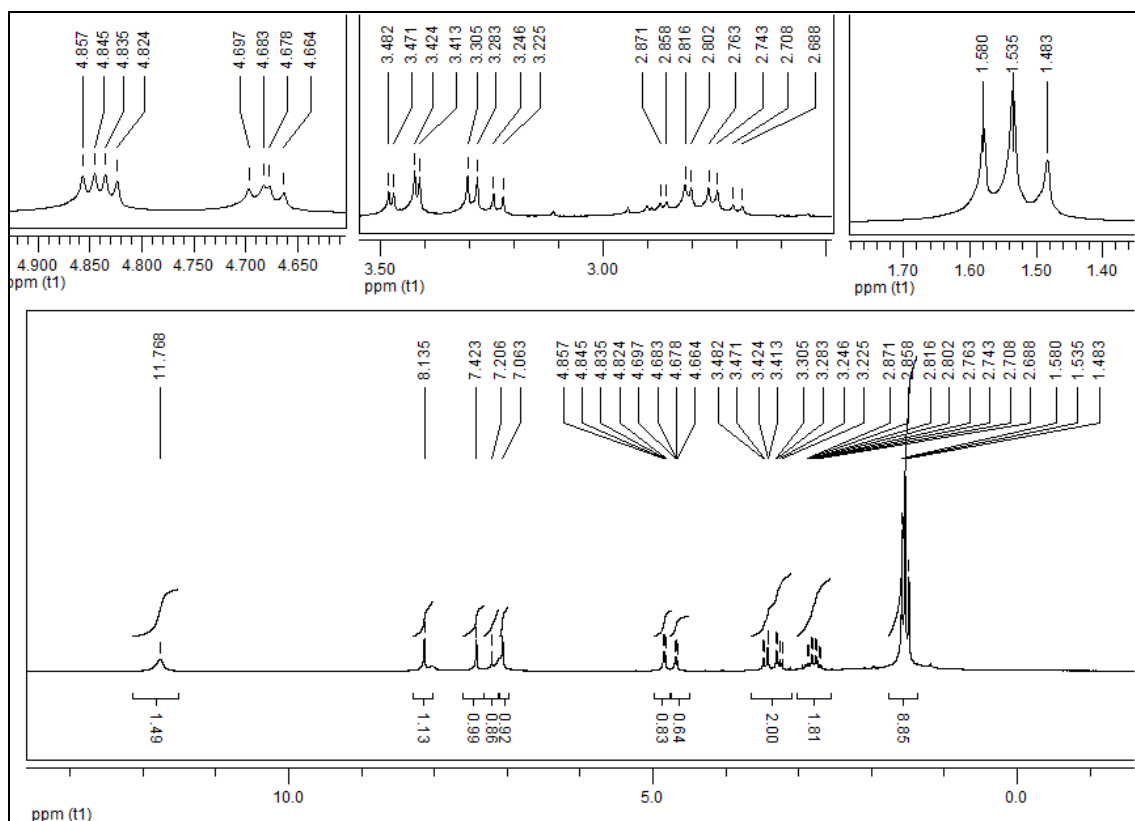
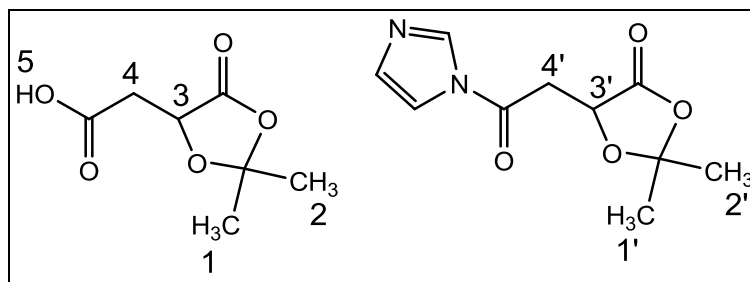
**Espectro 13.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido utilizando CDI (experimento C2). Software: MestreC 4.7.

- Experimento C3 (adaptado de HUSSAIN, LIEBERT, HEINZE, 2004)

O método C3 foi realizado com o objetivo de se obter o intermediário IA, aumentando o tempo de reação entre ácido málico protegido e CDI para 8 horas, favorecendo a obtenção do acilimidazol. A proporção molar utilizada para esse experimento foi a mesma que a utilizada para o experimento anterior (C2), sendo de 1:1:1,50 de ácido málico protegido, *mio*-inositol e CDI, respectivamente.

Ao término da reação, a placa de cromatografia em camada delgada em fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 mostrou a formação de duas manchas. A primeira, com *R<sub>f</sub>* de 0,25, correspondente ao ácido málico protegido livre, e a segunda, mais apolar, com *R<sub>f</sub>* de 0,87, que pode representar o intermediário IA.

O RMN de <sup>1</sup>H (Espectro 14) apresentou sinais do ácido málico protegido livre em 1,48 e 1,53 ppm (H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>), entre 2,68 e 2,87 ppm (H<sub>4</sub>), na região entre 4,66 e 4,69 ppm (H<sub>3</sub>) e em 11,76 ppm (H<sub>5</sub>). Em adição, o espectro mostrou sinais que sugerem a formação do acilimidazol, que deveria ter sofrido ataque nucleofílico do *mio*-inositol para a formação do intermediário IA, o que não ocorreu. Os sinais que evidenciam a obtenção desse intermediário estão entre 7,06 e 8,13 ppm (hidrogênios do anel imidazólico) e sinais do ácido málico protegido deslocados para campo baixo em 1,58 ppm, entre 3,22 e 3,48 ppm e entre 4,82 e 4,85 ppm, correspondentes aos hidrogênios metilílicos da proteção (H<sub>1'</sub> e H<sub>2'</sub>), hidrogênios H<sub>4'</sub> e H<sub>3'</sub> do ácido málico protegido, respectivamente. Ademais, os sinais do *mio*-inositol estão ausentes no espectro, sugerindo que o este não é um bom nucleófilo, assim como observado para o método do anidrido misto (método B). Portanto, o método C3 não foi eficiente na obtenção do composto de interesse.



**Espectro 14.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido utilizando CDI (método C3). Software: MestreC 4.7

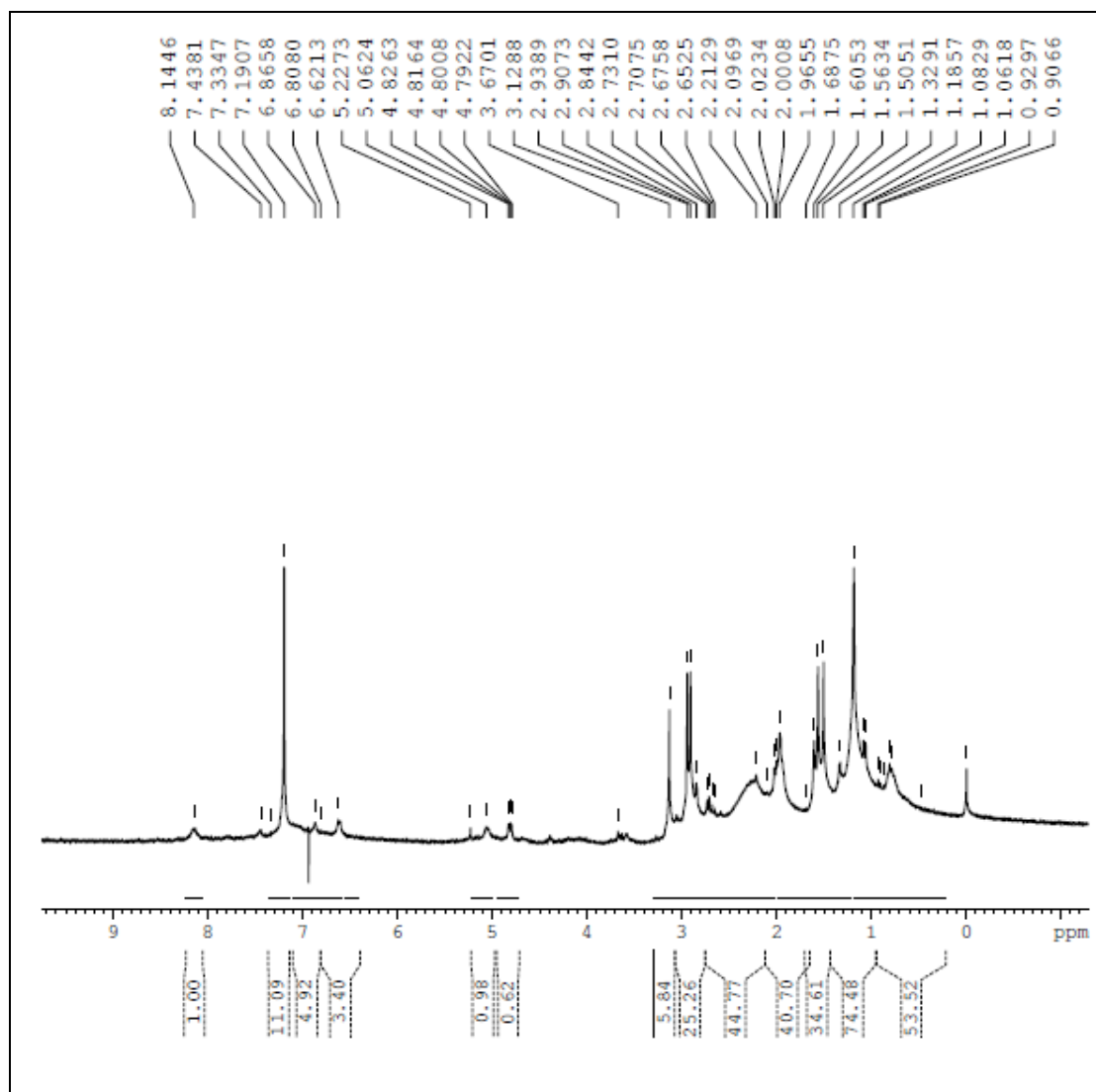
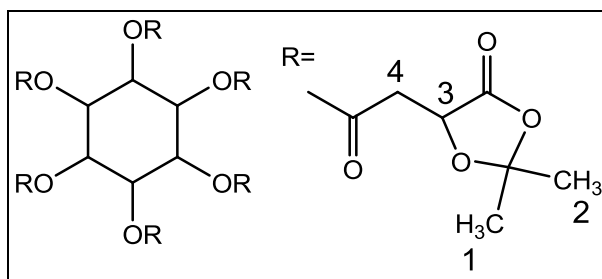
- Experimento C4 (adaptado de TUKULULA, 2009)

O objetivo do experimento C4 foi utilizar excesso do álcool para favorecer o ataque nucleofílico do *mio*-inositol ao acilimidazol, levando à formação do intermediário IA. A proporção molar utilizada para esse propósito foi de 2,5:1 (*mio*-inositol/ácido málico protegido, respectivamente).

Após 16 horas de reação, a cromatografia em camada delgada em fase móvel de hexano/acetato de etila 1:1 (v/v) mostrou a formação de duas manchas com valores de  $R_f$  de 0,26 e 0,86. A primeira mancha representa o ácido málico protegido, enquanto que a segunda, mais apolar, pode estar relacionada ao intermediário de interesse.

Apesar do excesso de sinais e da má qualidade do RMN de  $^1\text{H}$  do produto obtido (Espectro 15), o que dificulta sua interpretação, os sinais relativos ao ácido málico protegido podem ser observados em 1,50 e 1,55 ppm ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ), entre 2,65 e 2,93 ppm ( $\text{H}_4$ ) e entre 4,79 e 4,82 ppm ( $\text{H}_3$ ). Entretanto, os sinais correspondentes ao *mio*-inositol estão ausentes no espectro e, portanto, o intermediário IA não foi obtido.

Dessa forma, os experimentos que utilizaram CDI como agente condensante não foram satisfatórios. Entre as alternativas realizadas, o experimento C3 foi o que mais se aproximou da obtenção do composto de interesse. No entanto, não houve reação entre o acilimidazol e o *mio*-inositol para formação do éster desejado. Dessa maneira, foi necessária a busca por novos métodos mais eficazes que os discutidos anteriormente para a síntese do intermediário IA.

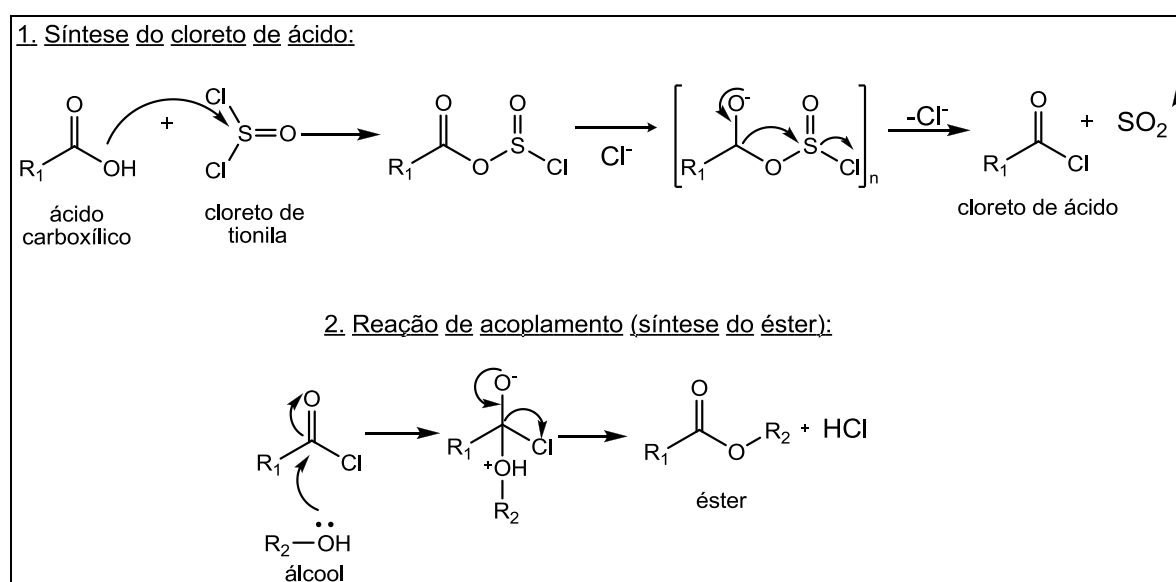


**Espectro 15.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido utilizando CDI (experimento C4).

➤ Método D: método do cloreto de ácido utilizando cloreto de tionila (adaptado de HOSAGANDI, DAVE, 1996)

Como nenhum dos métodos anteriores foi eficiente na obtenção do intermediário IA, optou-se por utilizar o método do cloreto de ácido. A formação de cloretos de ácido corresponde a um dos métodos mais simples de ativação do ácido carboxílico para síntese de ésteres e amidas. Normalmente, esse tipo de reação ocorre em duas etapas. A primeira etapa refere-se à conversão do ácido carboxílico em cloreto de ácido, utilizando um agente clorante como o cloreto de tionila. A segunda etapa é a reação de acoplamento do álcool ou da amina ao cloreto de ácido obtido na etapa anterior (Figura 42) (HAN, KIN, 2004; MONTALBETTI, FALQUE, 2005).

Uma das maiores desvantagens desse tipo de reação é a formação de ácido clorídrico no meio reacional. Alguns compostos como grupos protetores utilizados em síntese de peptídeos, podem ser sensíveis ao meio ácido. Para tanto, recomenda-se o uso de uma base para capturar o ácido clorídrico formado durante o processo sintético (MONTALBETTI, FALQUE, 2005).



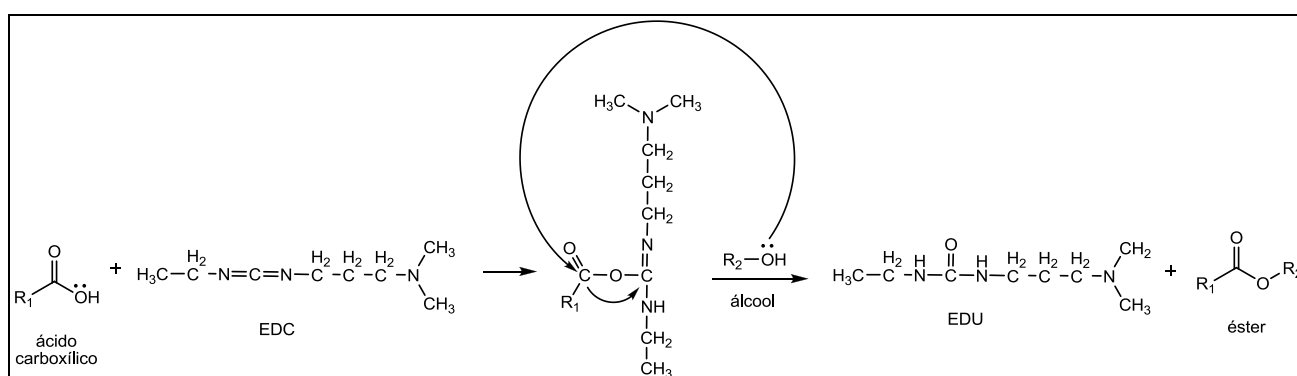
**Figura 42.** Mecanismo de reação de formação do éster com cloreto de tionila (ALLINGER et al., 1976).

Apesar da síntese com cloreto de ácido ser aparentemente simples, esse método não foi eficiente na obtenção do intermediário IA. Após 3 horas de reação, a cromatografia em camada delgada em fase móvel hexano/acetato

de etila 2:1 (v/v) mostrou a formação de uma mancha com o mesmo comportamento do material de partida, apresentando o mesmo valor de  $R_f$  do ácido málico protegido de 0,17. Portanto, não houve a formação do cloreto de ácido correspondente, tampouco do intermediário de interesse. Dessa maneira, a reação foi interrompida.

➤ Método E: método utilizando 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (adaptado de HORVATH, DEPRÉ, ORMEROD, 2008)

Considerando que o método com DCC (método A), apesar da dificuldade de purificação, foi o mais promissor na obtenção do intermediário IA em relação aos métodos utilizando 4-nitrofenilcloroformato (método B), CDI (método C) e cloreto de tionila (método E), o objetivo do método E foi utilizar outro agente de acoplamento com propriedades semelhantes ao DCC, no entanto, de fácil purificação. Com esse propósito utilizou-se o EDC, uma carbodiimida que, assim como o DCC, leva à formação de uma ureia como produto secundário, a (1-(3-diaminopropil)ureia) ou EDU. O EDU apresenta boa solubilidade em água e pode ser facilmente removido por extração aquosa ácida, o que faz do EDC uma alternativa interessante ao uso do DCC (MARDER, ALBERICIO, 2004; JOULLIÉ, LASSEN, 2010). O mecanismo de reação desse agente condensante encontra-se na Figura 43.



**Figura 43.** Mecanismo de reação do EDC (GIAROLLA, 2012).

Realizaram-se duas variações para o método utilizando EDC como agente condensante, os experimentos E1 e E2. Tanto para E1 quanto para E2,



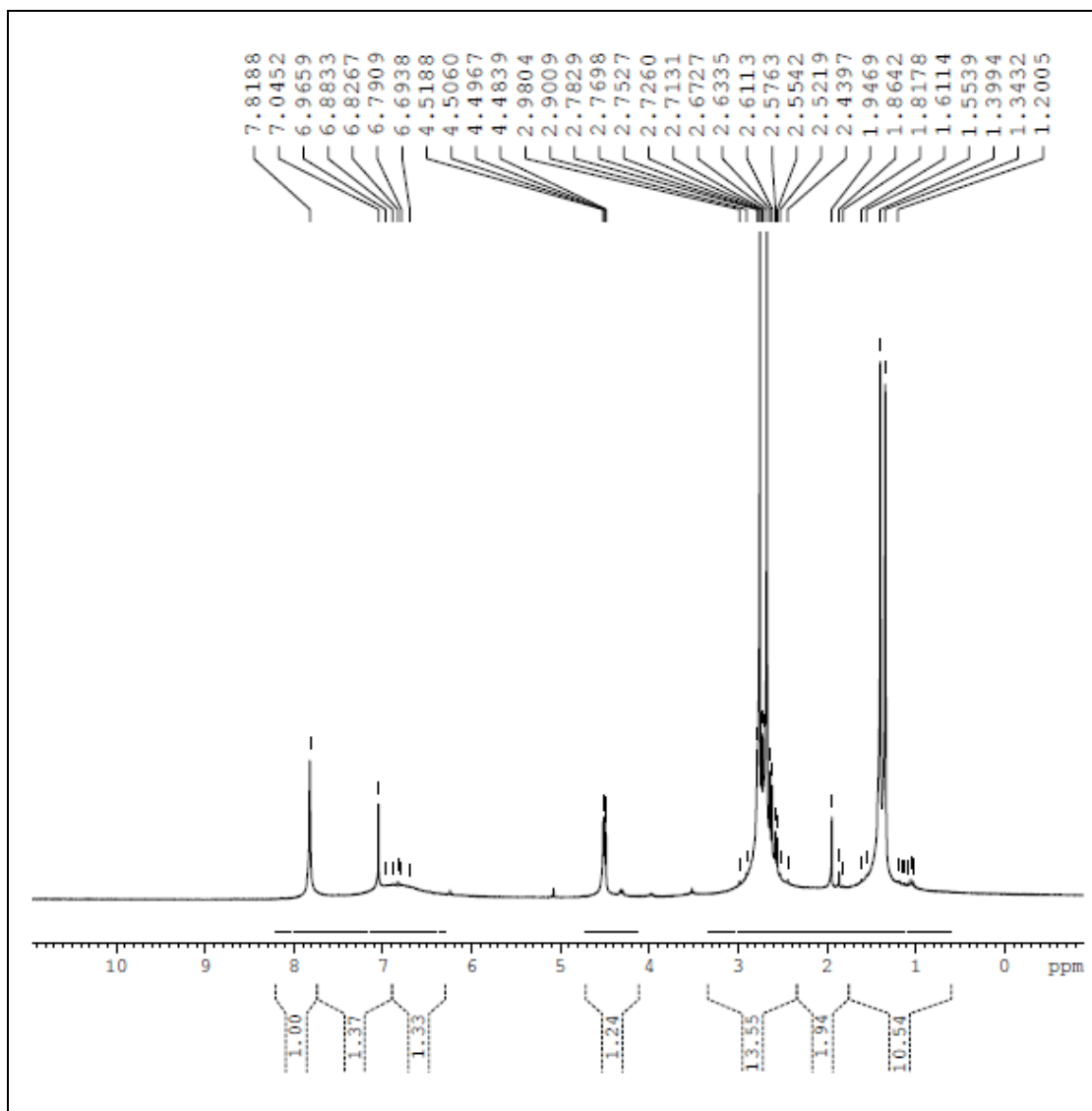
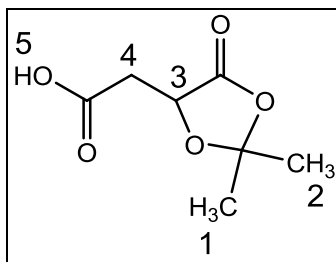
as proporções molares utilizadas seguiram o protocolo descrito por Horvath e colaboradores (2008), sendo a proporção molar entre ácido málico protegido e *mio*-inositol de 1:1,05, respectivamente. A diferença entre os dois experimentos foi que o E2 foi realizado em reator de micro-ondas, enquanto que para o E1 utilizou-se aquecimento convencional.

É importante ressaltar que a síntese orgânica em micro-ondas tem crescido intensamente nos últimos anos. São inúmeras as vantagens dessa técnica em relação aos métodos tradicionais, com destaque para a redução no tempo total de reação, além da possibilidade de maiores rendimentos. Isso só é possível porque o reator de micro-ondas faz a transferência direta de energia e, portanto, sem perda, ao contrário do aquecimento convencional. Além disso, essa transferência energética ocorre de maneira mais rápida e mais intensa, sendo capaz de gerar, em tempos menores, energia suficiente para ultrapassar a energia de ativação da formação do produto desejado, facilitando o processo sintético. Entre outras vantagens podemos citar, também, a segurança do método, apesar das altas temperaturas que podem ser alcançadas, além da necessidade de menor quantidade de reagentes e solventes (KATRITZKY et al., 2006).

Para o experimento E1, utilizando aquecimento convencional, após 24 horas de reação a cromatografia em camada delgada em fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v) mostrou a formação de duas manchas distintas. A mancha mais polar e com  $R_f$  de 0,28 corresponde ao ácido málico protegido livre. Já a mancha mais apolar, com  $R_f$  de 0,94, sugere a obtenção do intermediário de interesse.

Entretanto, o RMN de  $^1\text{H}$  do produto obtido por esse método não mostrou resultado satisfatório. O espectro apresenta sinais relativos ao ácido málico protegido em 1,39 e 1,34 ppm ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ), entre 2,55 e 2,78 ppm ( $\text{H}_4$ ), com exceção dos sinais em 2,67 e 2,57 ppm, que correspondem aos sinais do solvente utilizado na reação (DMF), e sinais na região de 4,48 e 4,51 ppm ( $\text{H}_3$ ). Os sinais em 7,04 e 7,18 ppm podem estar relacionados ao DMAP, catalisador utilizado no processo sintético. Contudo, os sinais do *mio*-inositol estão ausentes, indicando que esse método não foi eficiente na obtenção do intermediário IA.

Apesar das inúmeras vantagens oferecidas pela síntese em reator de micro-ondas, o experimento E2, assim como o E1, não permitiu a obtenção do composto desejado. Ao término de cada etapa da reação, uma alíquota foi retirada para análise por cromatografia em camada delgada em fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v). Entretanto, as sete etapas realizadas mostraram comportamento cromatográfico semelhante ao do ácido málico protegido, apresentando o mesmo valor de  $R_f$  de 0,28. Dessa maneira, o experimento com EDC em reator de micro-ondas não resultou no produto de interesse.



**Espectro 17.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre *myo*-inositol e ácido málico protegido utilizando EDC (experimento E1).

#### 4.1.2.2 Síntese do intermediário IB – etilenoglicol como foco central

Frente às dificuldades observadas na síntese do dendrímero utilizando *mio*-inositol como foco central, realizou-se, em paralelo ao trabalho original, a síntese do dendrímero utilizando etilenoglicol como alternativa ao *mio*-inositol.

A escolha desse novo foco central foi baseada no número de grupos funcionais presentes na estrutura dessa molécula. Considerou-se que moléculas com menos grupos funcionais permitiriam maior controle do processo sintético, bem como poderiam favorecer o maior número de substituições por menor impedimento estérico entre as ramificações e o centro. Além do etilenoglicol, outros focos centrais com menos grupos funcionais em relação ao *mio*-inositol, como a etilenodiamina e o glicerol, foram estudados pelo grupo do LAPEN para esse propósito (resultados não mostrados). Entretanto, os resultados mais promissores foram observados com o etilenoglicol e estes serão discutidos com mais detalhes a seguir.

➤ Método A: método do anidrido misto (adaptado de VARGAS, 2007)

- Experimento A1: método utilizando cloroformato de etila

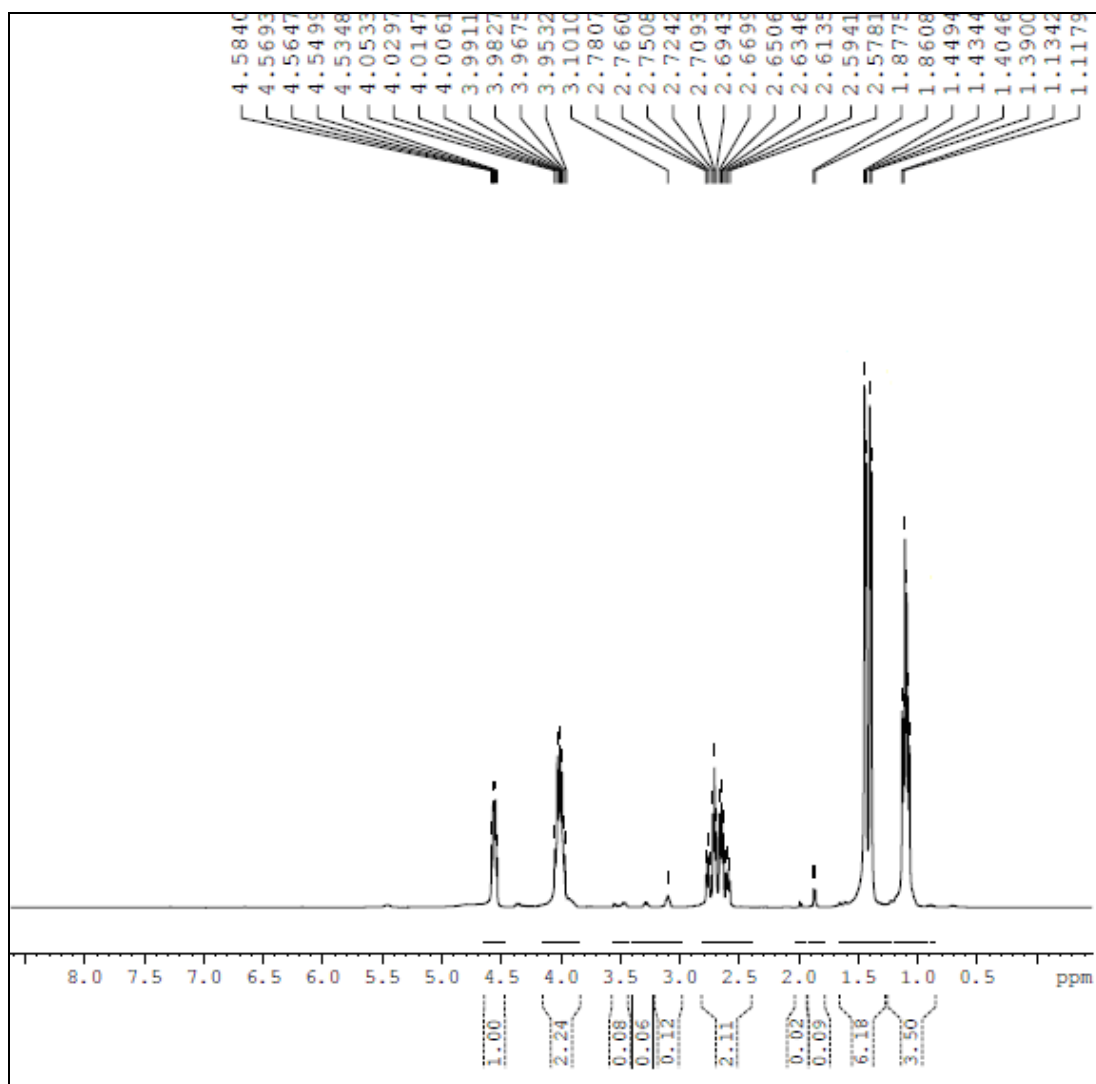
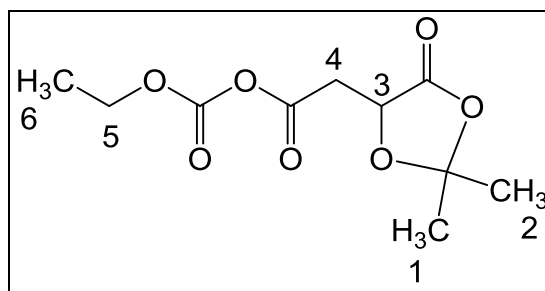
O método A1 utilizou cloroformato de etila como agente condensante e *N*-metilmorfolina, como catalisador. O cloroformato de etila, assim como o 4-nitrofenilcloroformato, já citado anteriormente, é utilizado no método do anidrido misto para síntese de ésteres, aminas e tioésteres (MONTALBETTI, FALQUE, 2005). A proporção molar empregada foi de 1:2 de foco central e ácido málico protegido, respectivamente, objetivando o maior número de substituições possíveis ao foco central.

A placa de cromatografia em camada delgada, após 24 horas de reação, mostrou a formação de uma mancha com *R<sub>f</sub>* de 0,66, valor diferente dos materiais de partida, que foram 0,35 para o etilenoglicol e 0,57 para o ácido málico protegido, em fase móvel hexano/acetato de etila 2:1 (v/v).

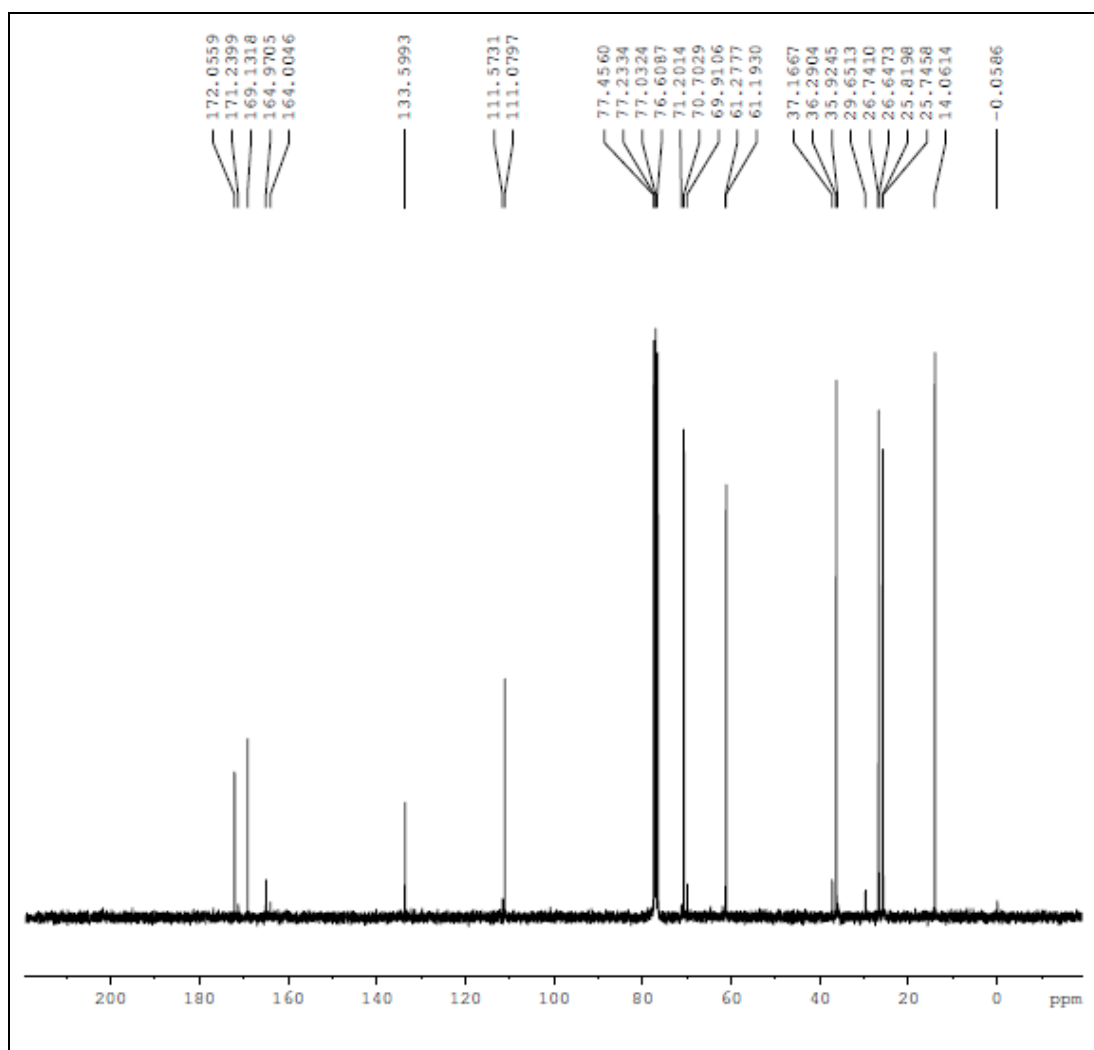
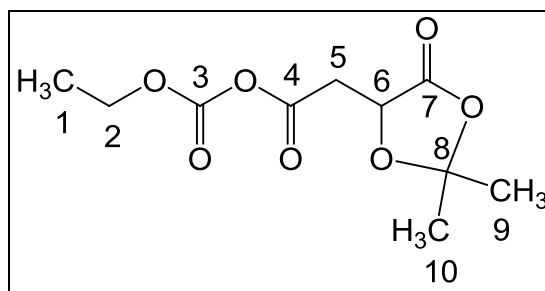
O espectro RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 18) apresentou sinais do ácido málico protegido em 1,43 e 1,44 ppm, relativos aos hidrogênios das metilas da lactona ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ). Os sinais entre 2,57 e 2,78 ppm e próximos de 4,53 e 4,58 ppm são relacionados aos hidrogênios  $\text{H}_4$  e  $\text{H}_3$ , respectivamente, do ácido málico protegido. Entretanto, os sinais do etilenoglicol não foram observados, o que indica que não houve a formação do produto desejado.

De maneira semelhante ao que foi discutido anteriormente para a síntese do intermediário IA com 4-nitrofenilclorofornato, durante o mecanismo de reação, o clorofornato de etila forma um intermediário de síntese, um anidrido misto, com o ácido envolvido na reação. Esse anidrido misto deve sofrer um ataque nucleofílico do álcool, para que ocorra a formação do éster. Entretanto, esse ataque nucleofílico não ocorreu. Portanto, o que se observa no espectro é o anidrido misto formado entre o clorofornato de etila e o ácido málico protegido. Os sinais em 1,11 e 1,13 ppm e próximos a 4,00 ppm estão relacionados aos hidrogênios do  $\text{H}_5$  e do  $\text{H}_6$ . A presença desse intermediário de síntese pode ser confirmada no RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 19). Esse espectro apresentou sinais em 14,06, 61,21 e 169,13 ppm, relativos aos carbonos  $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_2$  e a carbonila do anidrido misto ( $\text{C}_3$ ), respectivamente. Também estão presentes os sinais do ácido málico protegido em 25 e 26, 35, 70, 110, 164 e 170 ppm, referentes, respectivamente, aos carbonos das metilas da lactona ( $\text{C}_9$  e  $\text{C}_{10}$ ),  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_5$ ,  $\text{C}_6$ ,  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_7$  desse intermediário.

Portanto, a reação com clorofornato de etila levou à formação do anidrido misto, que se apresentou estável frente ao ataque nucleofílico do foco central, impedindo a formação do éster desejado.



**Espectro 18.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre etilenoglicol e ácido málico protegido utilizando clorofornato de etila (experimento A1).



**Espectro 19.** RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre etienoglicol e ácido málico protegido utilizando clorofornato de etila (experimento A1).

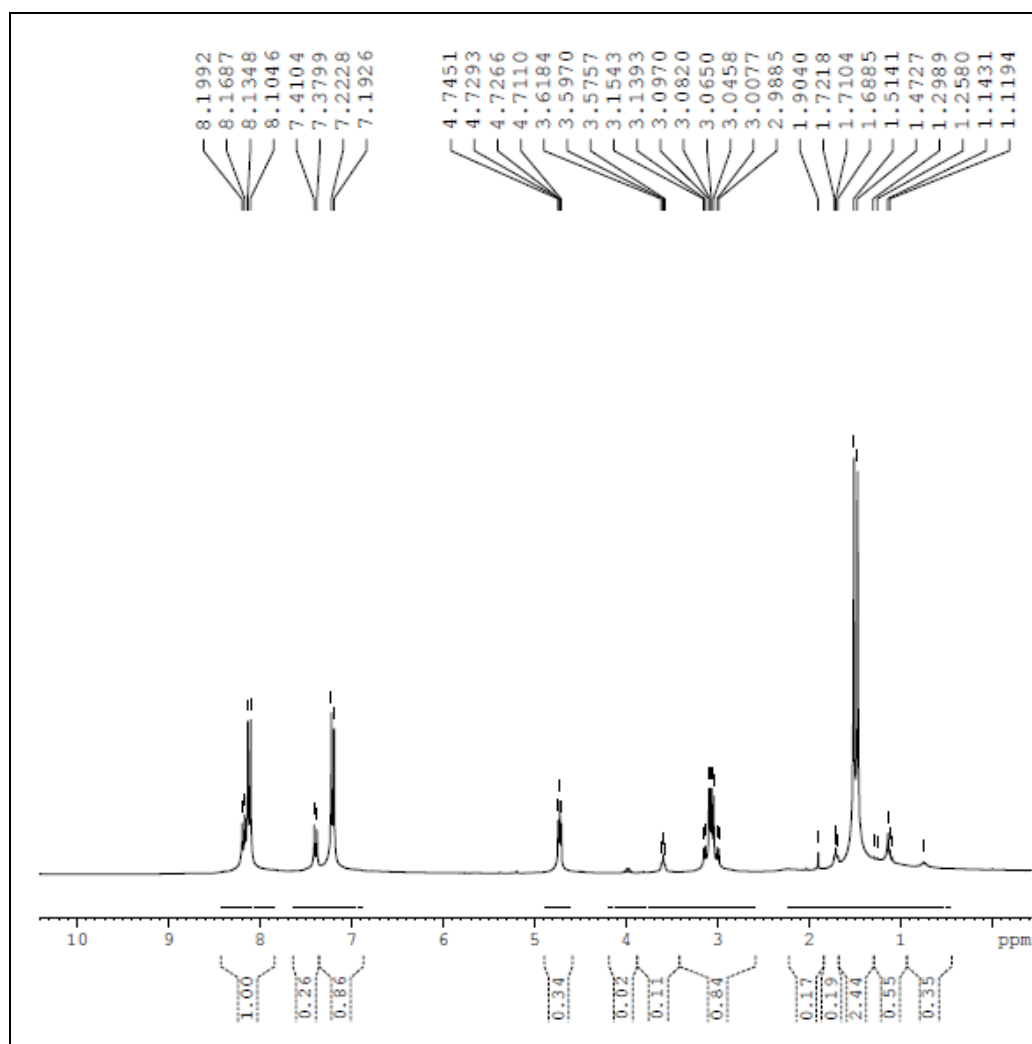
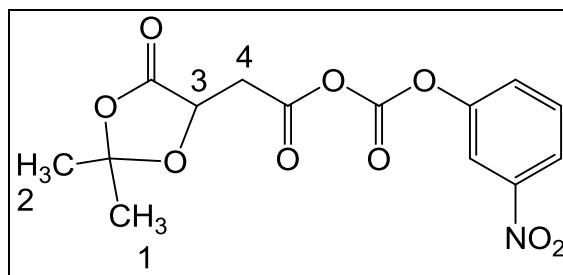
- Experimento A2: método utilizando 4-nitrofenilcloroformato

Para o experimento A2, utilizou-se como o agente condensante o 4-nitrofenilcloroformato, objetivando favorecer o ataque nucleofílico do etilenoglicol ao anidrido misto (intermediário de síntese), considerando que o grupo nitrofenil corresponde a melhor grupo de saída em relação ao grupo etila do cloroformato de etila, utilizado no método anterior. Além disso, há diferenças maiores entre as duas carbonilas do anidrido misto, o que é importante para o ataque nucleofílico subsequente.

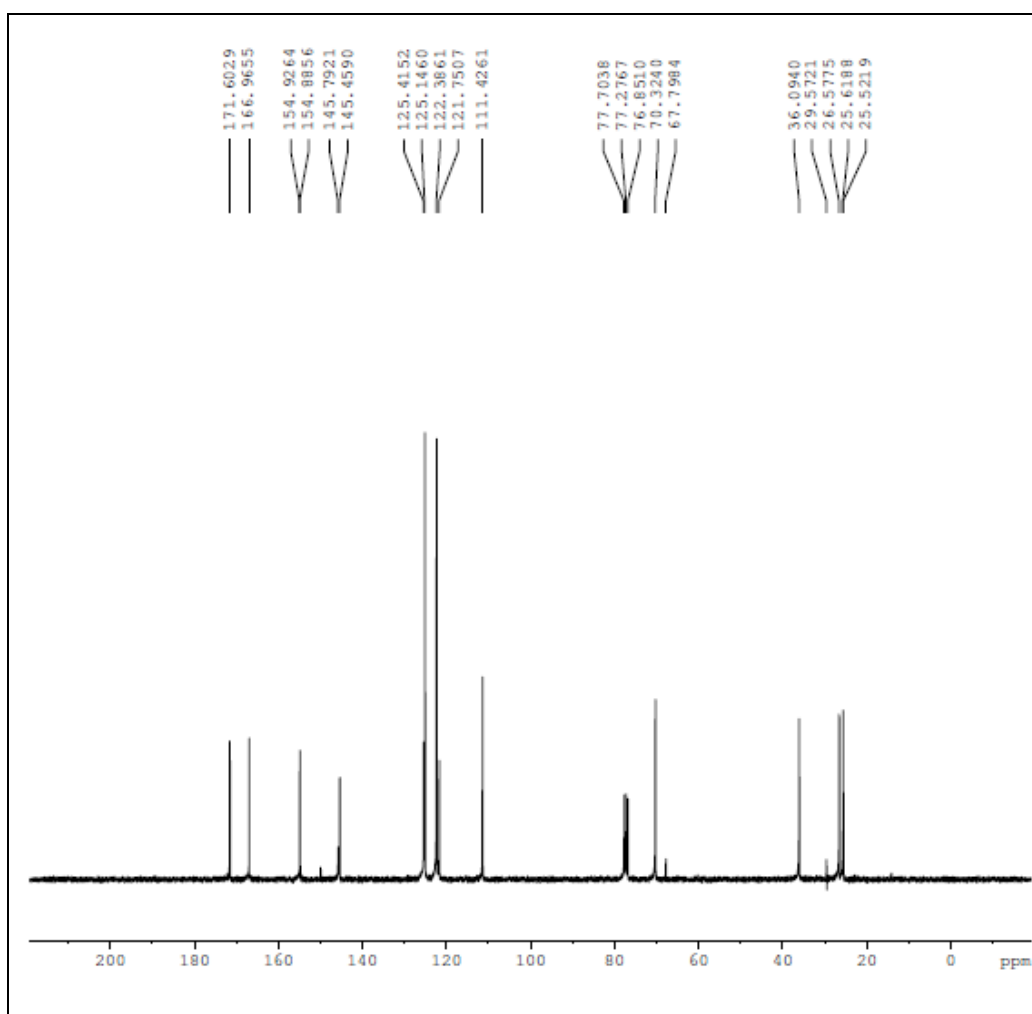
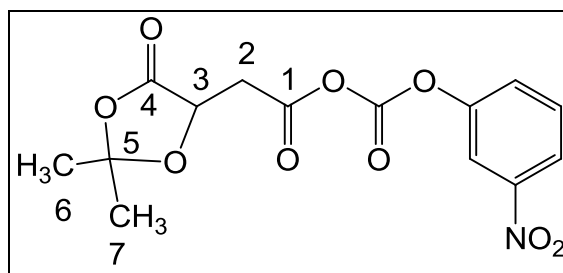
A proporção molar utilizada na reação foi de 1:2 (foco central e ácido málico protegido, respectivamente). Após 24 de reação, a cromatografia em camada delgada em fase móvel hexano/acetato de etila 2:1 (v/v) apresentou duas manchas com valores de  $R_f$  de 0,41 e 0,61, mais apolares em relação ao material de partida (etilenoglicol,  $R_f$  0,35). A mancha mais apolar, de  $R_f$  0,61, pode estar relacionada ao intermediário IB.

No entanto, o resultado obtido para esse método não foi satisfatório. O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 20) apresentou sinais relacionados aos hidrogênios do ácido málico protegido em 1,47 e 1,51 ppm ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ), entre 2,98 e 3,15 ppm ( $\text{H}_4$ ) e entre 4,71 e 4,74 ppm ( $\text{H}_3$ ). Nesse espectro, são evidentes, também, os sinais dos hidrogênios do anel nitrofenila entre 7,19 e 8,19 ppm, indicando que assim como para o método anterior, ocorreu a formação do anidrido misto estável frente ao ataque nucleofílico do álcool. Em adição, o RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 21) confirma a formação desse anidrido, por meio dos sinais em 145 ppm, relativos ao carbono carbonílico do 4-nitrofenilcloroformato, além dos sinais dos carbonos do anel nitrado entre 120 e 140 ppm. Ademais, os sinais dos carbonos do ácido málico protegido podem ser encontrados em: 25,61 e 26,5 ppm ( $\text{C}_6$  e  $\text{C}_7$ ); 36,09 ppm ( $\text{C}_5$ ); 70,32 ppm ( $\text{C}_2$ ); 114,42 ( $\text{C}_3$ ); 166,96 ppm ( $\text{C}_1$ ) e 171,60 ( $\text{C}_4$ ). Dessa maneira, assim como o *mio*-inositol, o etilenoglicol não foi um bom nucleófilo para esse método e o intermediário IB não foi obtido.





**Espectro 20.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre etilenoglicol e ácido málico protegido utilizando 4-nitrofenilcloroformato (experimento A2).



**Espectro 21.** RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre etilenoglicol e ácido málico protegido utilizando 4-nitrofenilclorofomato (experimento A2).

➤ Método B: método utilizando EDC como agente condensante

Como os métodos anteriores que empregaram cloroformato de etila e 4-nitrofenilcloroformato não foram eficientes na síntese do intermediário IB, optou-se por utilizar o EDC como agente condensante para as reações do método B. A escolha desse reagente foi baseada na boa solubilidade em água do produto secundário da reação (EDU), o que poderia facilitar o processo de purificação dos compostos obtidos, como foi discutido anteriormente.

- Experimento B1 (adaptado de GOLDBERGH, GHANDEHARI, SWAN, 2010; GIAROLLA, 2012)

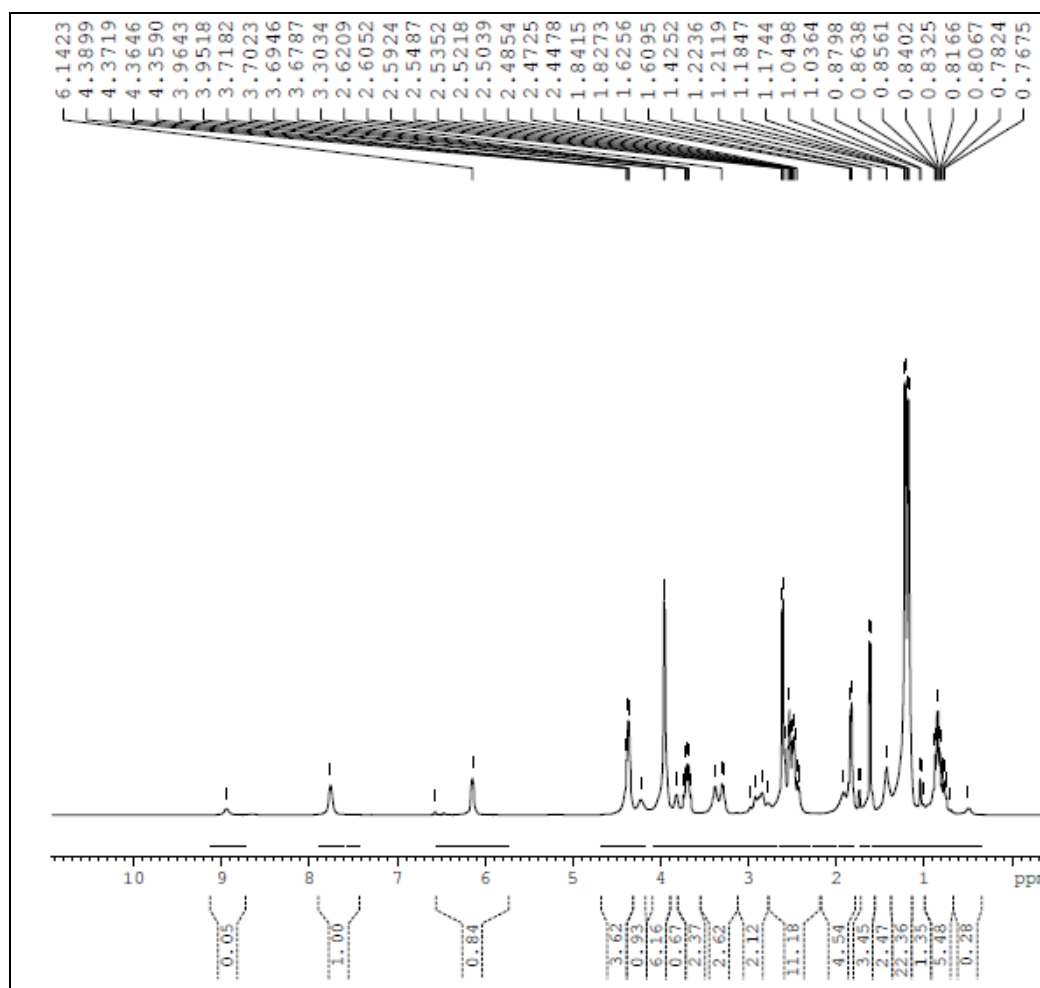
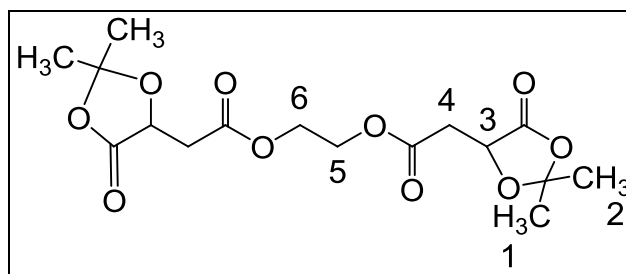
A proporção molar utilizada para esse método de etilenoglicol e ácido málico protegido foi de 1:2, respectivamente. Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada em fase móvel clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) mostrou a formação de mancha com  $R_f$  de 0,69, valor diferente dos materiais de partida, etilenoglicol ( $R_f$  0,25) e ácido málico protegido (0,37).

O RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 22) apresentou sinais em 1,60 e 1,62 ppm, que são indicativos dos hidrogênios metílicos do ácido málico protegido ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ). Podem-se observar, também, sinais entre 2,44 e 2,59 ppm e na região de 4,35 e 4,38 ppm, relativos aos hidrogênios  $\text{H}_4$  e  $\text{H}_3$  do espaçante, respectivamente. Em adição, o singleto em 3,96 ppm pode ser relativo aos hidrogênios do etilenoglicol ( $\text{H}_6$  e  $\text{H}_5$ ), sugerindo a obtenção do intermediário IB com duas ramificações.

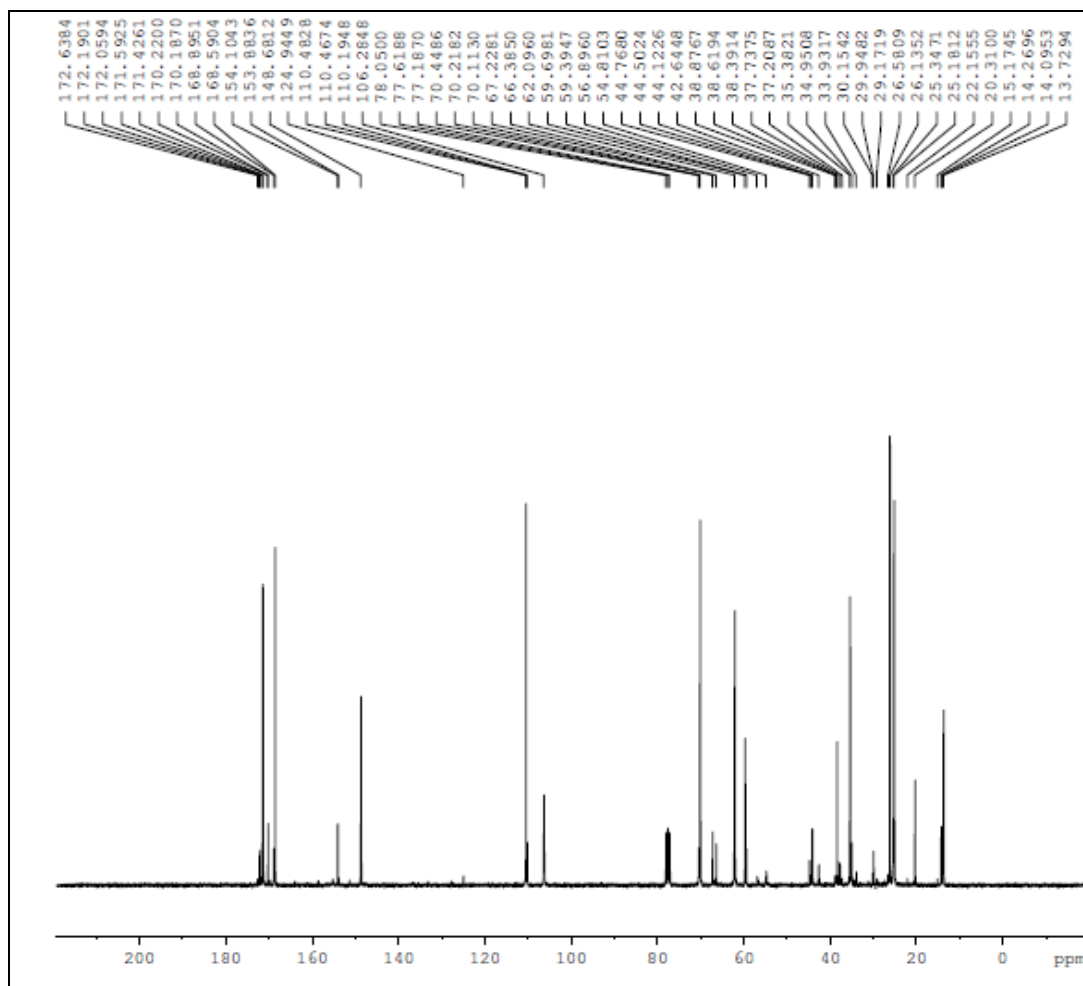
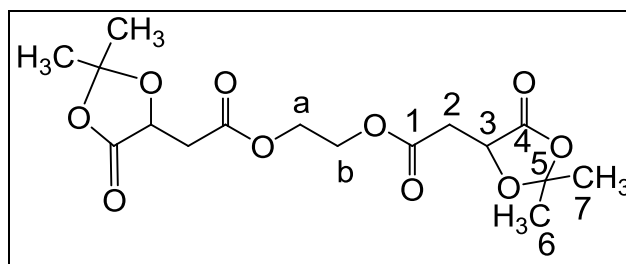
O RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 23) apresentou sinais em 25,18 e 25,34, 26,13 e 26,58 ppm, que caracterizam carbonos das metilas do ácido málico protegido ( $\text{C}_6$  e  $\text{C}_7$ ). Os sinais próximos de 35, 70 e 110 ppm podem estar relacionados aos carbonos  $\text{C}_5$ ,  $\text{C}_2$  e  $\text{C}_3$  do espaçante, respectivamente. As carbonilas do ácido málico protegido e do éster formado podem ser observadas pelos sinais entre 170 e 172 ppm. Ademais, o sinal relativo ao carbono do etilenoglicol aparece em 62,09 ppm.

Apesar dos indícios da obtenção do produto, o excesso de impurezas nos espectros mostra que o EDU não foi removido com sucesso pela extração

aquosa utilizada no tratamento da reação, sendo necessário realizar a purificação do composto por coluna cromatográfica.



**Espectro 22.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre etilenoglicol e ácido málico protegido utilizando EDC (experimento B1).



**Espectro 23.** RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre etilenoglicol e ácido málico protegido utilizando EDC (experimento B1).

- Experimento B2 (adaptado de HORVATH, DEPRÉ, ORMEROD, 2008)

Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada em fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v) mostrou a formação de duas manchas com  $R_f$  de 0,42 e 0,76. A obtenção de dois produtos com diferentes polaridades pode indicar a formação do intermediário IB com uma substituição (mais polar,  $R_f$  0,42) e duas substituições de ácido málico protegido (mais apolar,  $R_f$  0,76).

O RMN de  $^1\text{H}$  do produto impuro (Espectro 24) apresenta sinais, que podem estar relacionados ao intermediário IB com diferentes substituições, como indicado pela placa cromatográfica. Os espectro apresenta sinais do ácido málico protegido em 1,54 e 1,59 ppm ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ), entre 2,76 e 2,97 ppm ( $\text{H}_4$ ) e entre 4,67 e 4,72 ppm ( $\text{H}_3$ ). Ademais, os sinais do etilenoglicol com uma substituição estão na região entre 3,77 e 3,80 ppm ( $\text{H}_5$ ) e entre 4,21 e 4,26 ppm ( $\text{H}_6$ ). O singlete em 4,32 ppm indica a obtenção do intermediário IB com duas substituições ( $\text{H}_5'$  e  $\text{H}_6'$ ).

O RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 25) apresentou-se coerente ao RMN de  $^1\text{H}$ . Podem-se observar sinais dos carbonos do ácido málico protegido em 25,64 ppm e 26,55 ppm ( $\text{C}_6$  e  $\text{C}_7$ ), 35,93 ppm ( $\text{C}_2$ ), 70,44 ppm ( $\text{C}_5$ ), 111,21 ppm ( $\text{C}_3$ ), 169,28 ppm ( $\text{C}_1$ ) e 172,26 ppm ( $\text{C}_4$ ), em adição aos sinais correspondentes aos carbonos do etilenoglicol do intermediário com uma ramificação, que estão em 60,25 ppm ( $\text{C}_b$ ) e 66,50 ppm ( $\text{C}_a$ ), e sinais dos carbonos do intermediário com duas ramificações em 63,49 ppm ( $\text{C}_{a'}$  e  $\text{C}_{b'}$ ).

Como houve indícios da obtenção do intermediário IB por esse método, o produto obtido foi purificado por coluna cromatográfica, utilizando como eluente hexano e acetato de etila em gradiente de concentração. As proporções utilizadas foram de 1:0; 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 4:6; 3:7 e 2:8 (v/v) de hexano e acetato de etila, respectivamente. Esse procedimento foi realizado com sucesso e as frações com  $R_f$  de 0,42 e 0,76 foram isoladas.

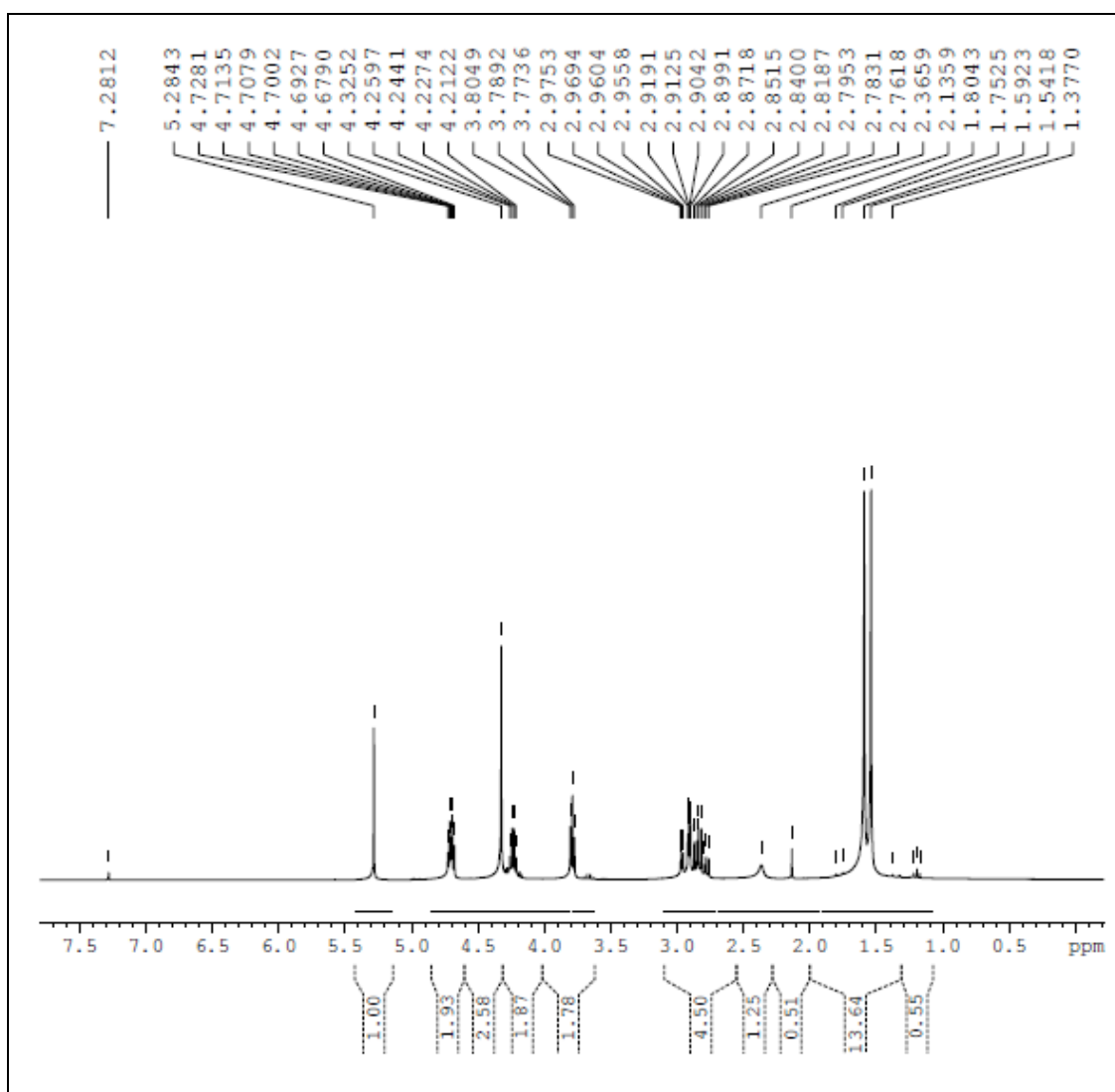
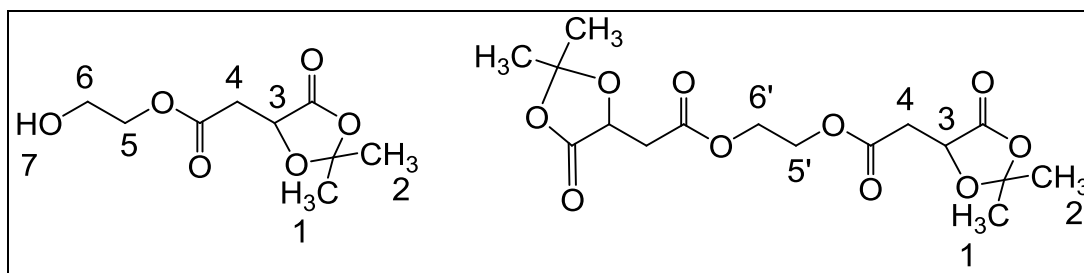
O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 26) da primeira fração ( $R_f$  0,76) apresentou sinais referentes ao intermediário IB dissustituído puro. A obtenção desse produto pode ser confirmada pelos sinais do ácido málico protegido em 1,50 e 1,55 ppm ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ), em 2,82 ppm ( $\text{H}_4$ ) e em 4,65 ppm ( $\text{H}_3$ ). Ademais, o sinal dos hidrogênios do etilenoglicol ( $\text{H}_5'$  e  $\text{H}_6'$ ) está representado por um singlete

em 4,28 ppm. O RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 27) confirma a obtenção desse composto. O sinal correspondente aos carbonos do etilenoglicol ( $\text{C}_a$  e  $\text{C}_b$ ) pode ser observado em 62,47 ppm e os sinais dos carbonos do ácido málico protegido podem ser observados em 25,76 ppm e 26,71 ppm ( $\text{C}_6$  e  $\text{C}_7$ ), 36,02 ppm ( $\text{C}_2$ ), 70,49 ppm ( $\text{C}_5$ ), 111,14 ppm ( $\text{C}_3$ ), 168,90 ppm ( $\text{C}_1$ ) e 171,83 ppm ( $\text{C}_4$ ).

A segunda fração isolada na coluna cromatográfica corresponde ao derivado monossustituído ( $R_f$  0,42). O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 28) e o RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 29) confirmam a obtenção desse produto, pois além dos sinais do ácido málico protegido já discutidos anteriormente, os sinais referentes ao etilenoglicol no RMN de  $^1\text{H}$  estão presentes em 3,73 e 4,17 ppm ( $\text{H}_5$  e  $\text{H}_6$ , respectivamente) e em 60,25 ( $\text{C}_b$ ) e 66,56 ppm ( $\text{C}_a$ ) no RMN de  $^{13}\text{C}$ .

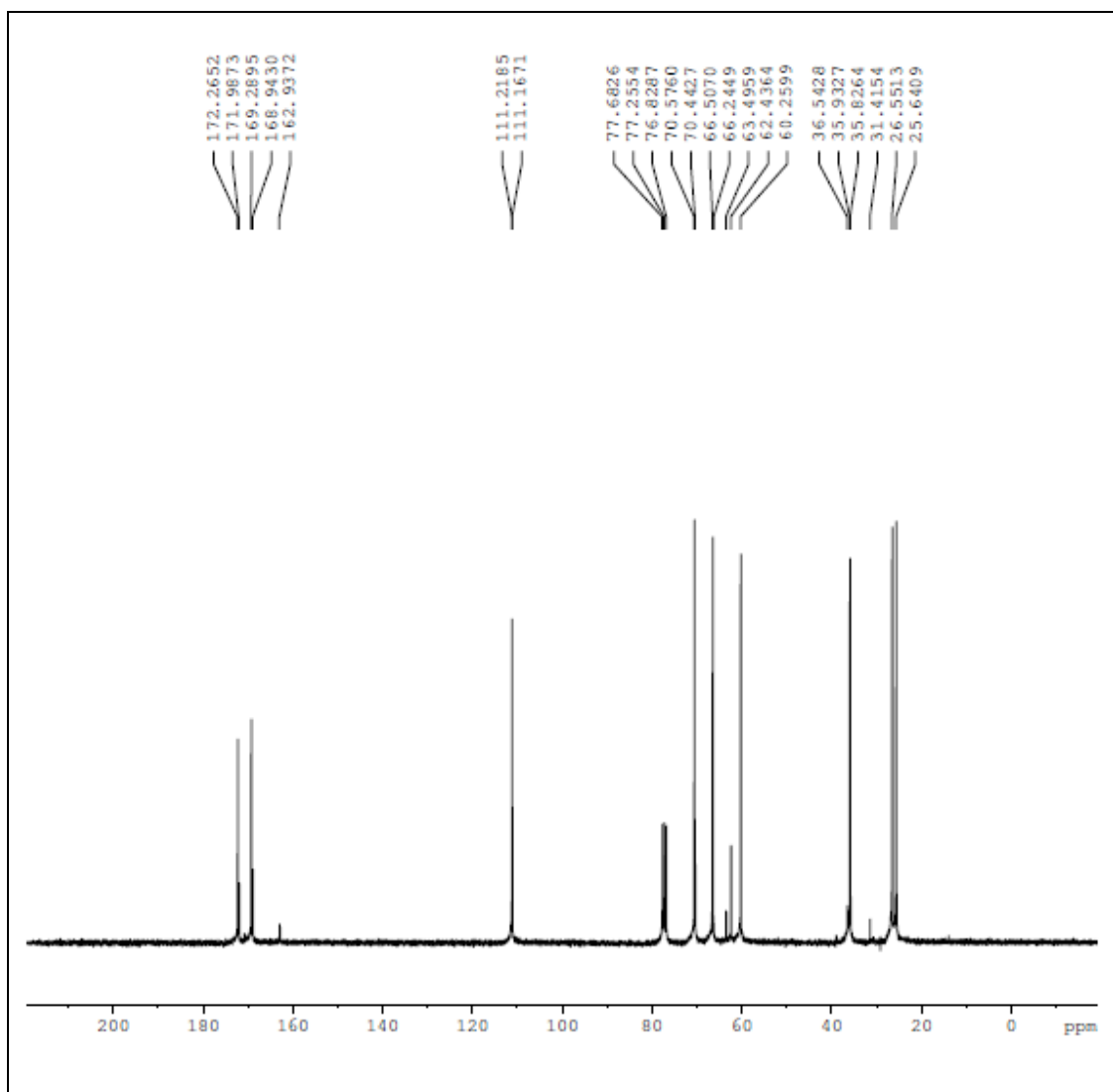
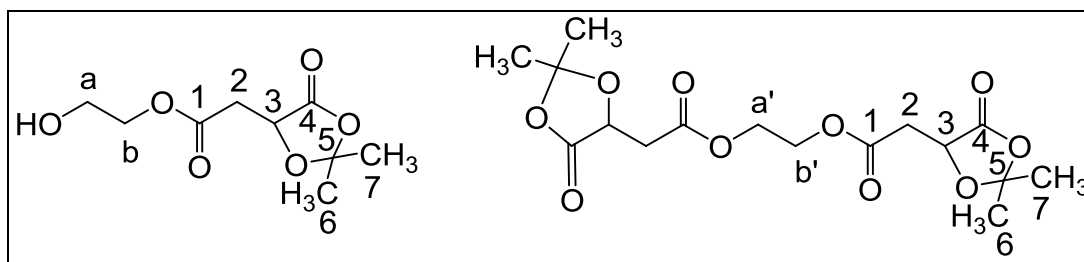
Os produtos purificados pela coluna cromatográfica apresentaram-se como um óleo de cor amarelo claro e os rendimentos obtidos foram de 24% para o intermediário com uma ramificação e 32% para o intermediário com duas ramificações.

Apesar do resultado satisfatório obtido com esse método na síntese do intermediário IB, vale ressaltar que o mesmo protocolo de síntese foi aplicado para a síntese do intermediário IA (foco central de *mio*-inositol). Entretanto, este mesmo procedimento não foi eficiente na obtenção composto de interesse.

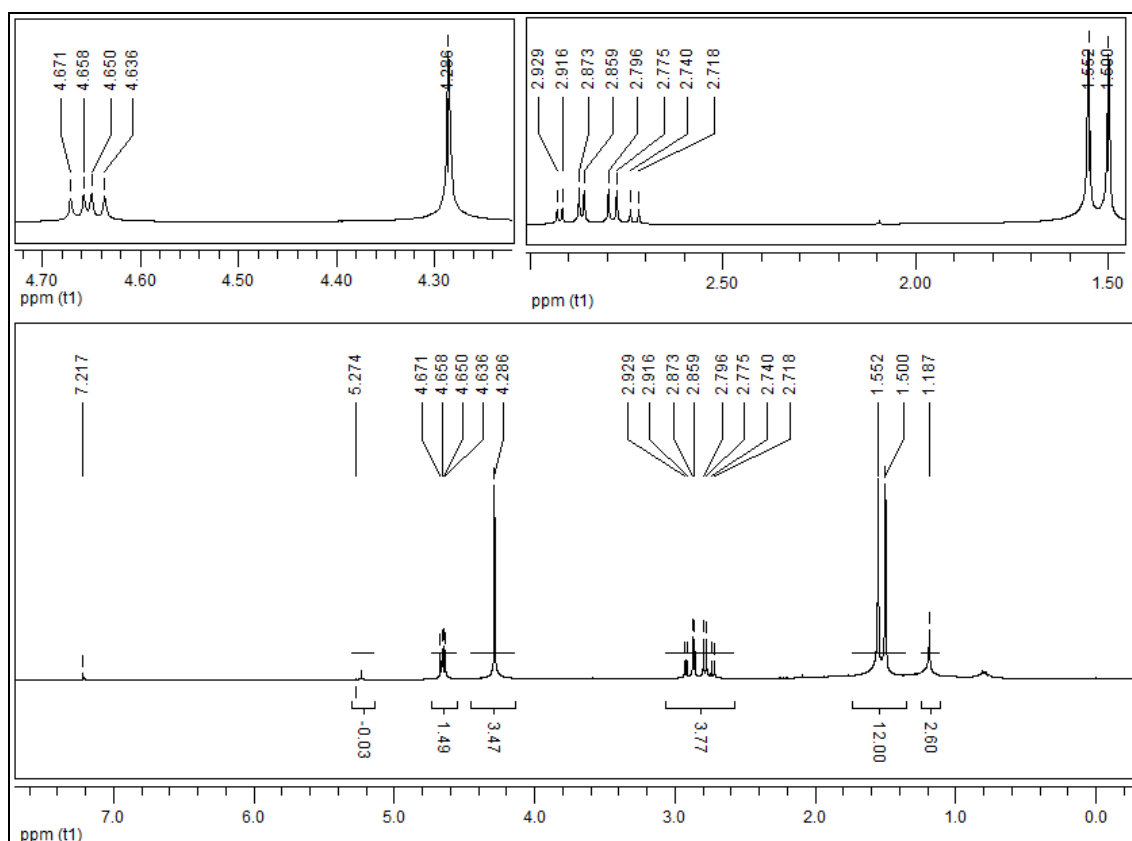
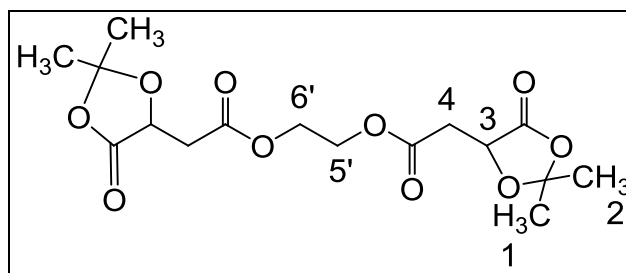


**Espectro 24.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre etilenoglicol e ácido málico protegido utilizando EDC (experimento B2).





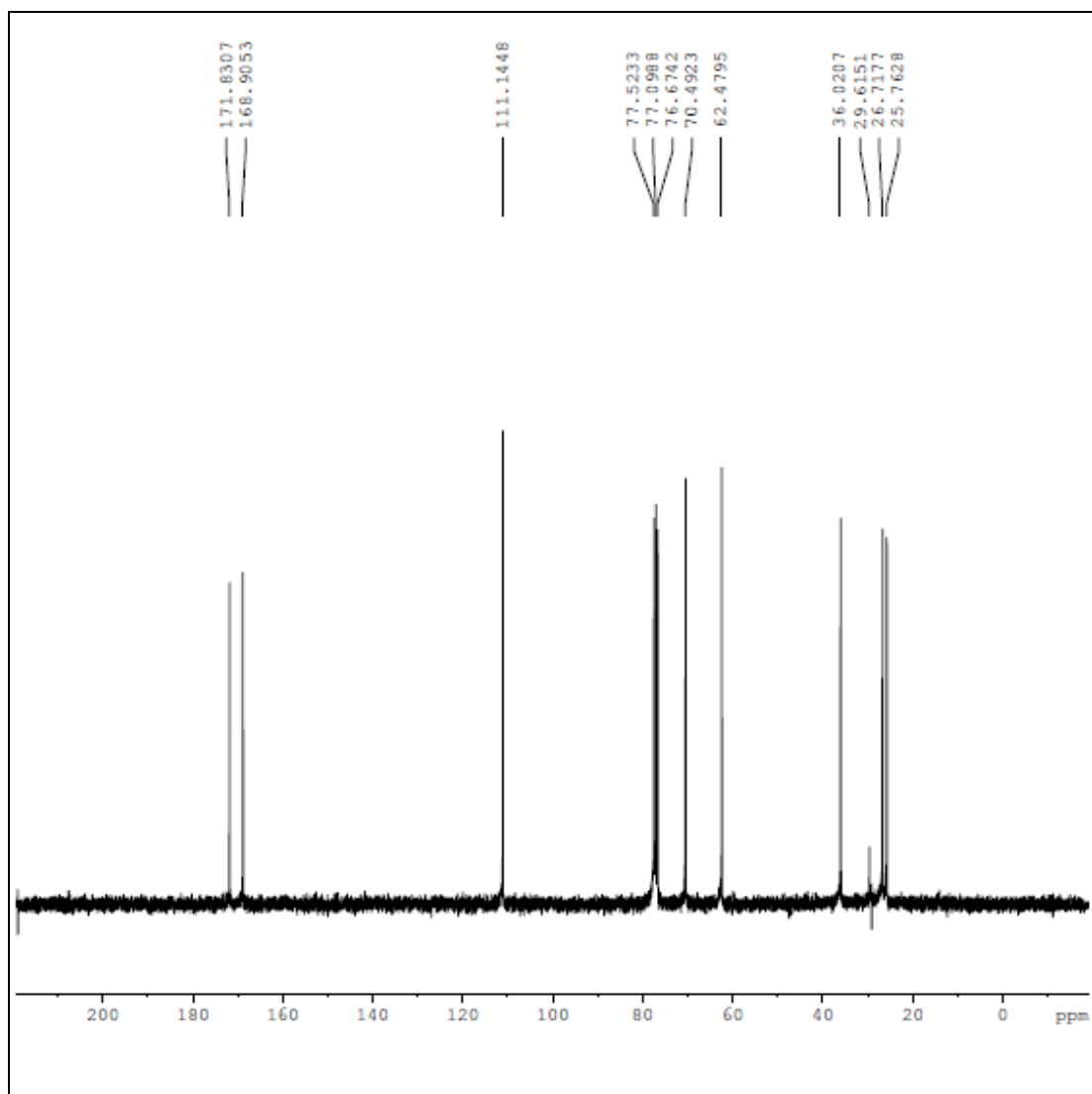
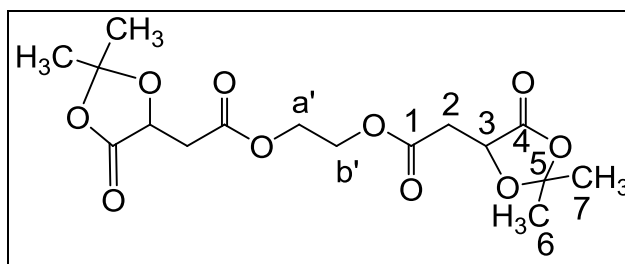
**Espectro 25.** RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre etilenoglicol e ácido málico protegido utilizando EDC (experimento B2).



**Espectro 26.** RMN  $^1\text{H}$  do intermediário IB com duas ramificações utilizando EDC (experimento B2). Software: MestreC 4.7.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), 300 MHz,  $\delta$  = ppm**

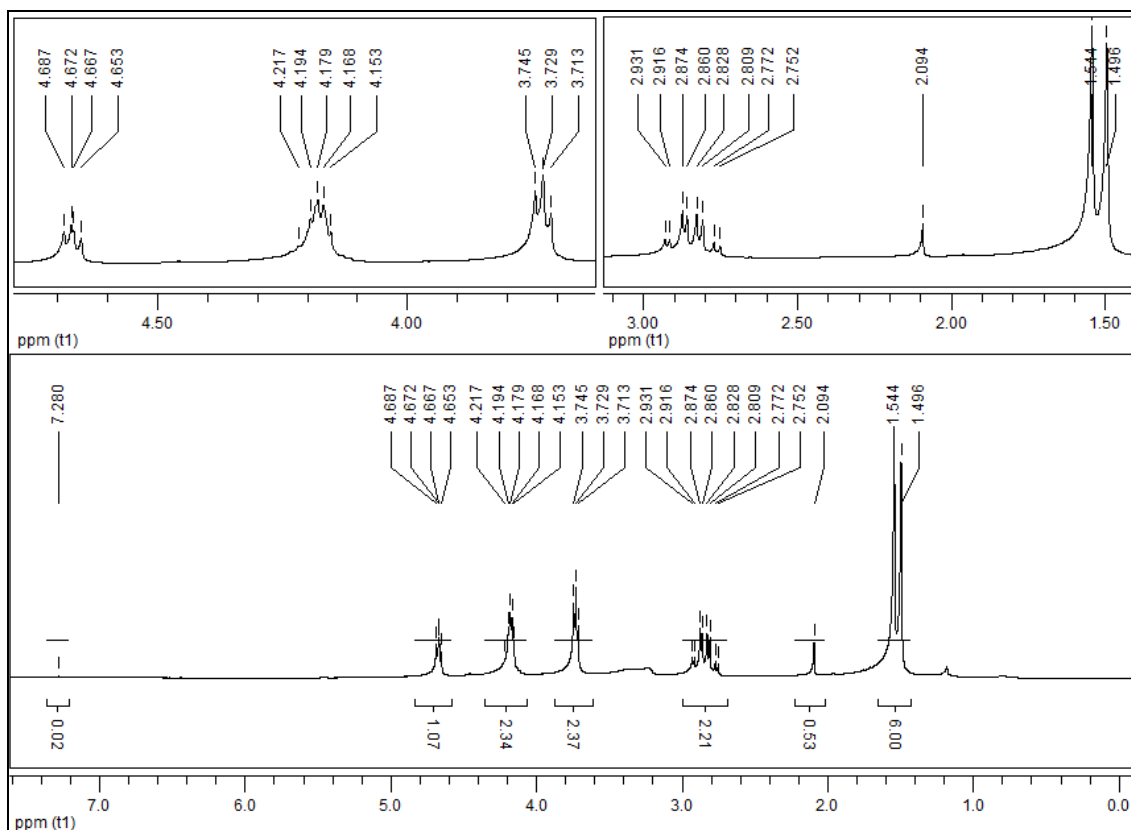
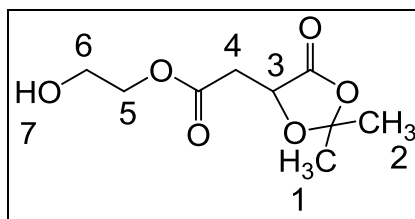
7,21 ( $\text{CDCl}_3$ ); 1,50, 1,55 (s, 12H,  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$ ); 2,82 (ddd, 4H,  $\text{H}_4$ ,  $J = 3,9$  Hz,  $J = 18$  Hz,  $J = 6,6$  Hz,  $J = 18$  Hz); 4,28 (s, 4H,  $\text{H}_6'$ ,  $\text{H}_5'$ ); 4,65 (dd, 1H,  $\text{H}_3$ ,  $J = 6,6$  Hz,  $J = 3,9$  Hz)



**Espectro 27.** RMN <sup>13</sup>C do intermediário IB com duas ramificações utilizando EDC (experimento B2). Software: MestreC 4.7.

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>), 75 MHz, δ = ppm**

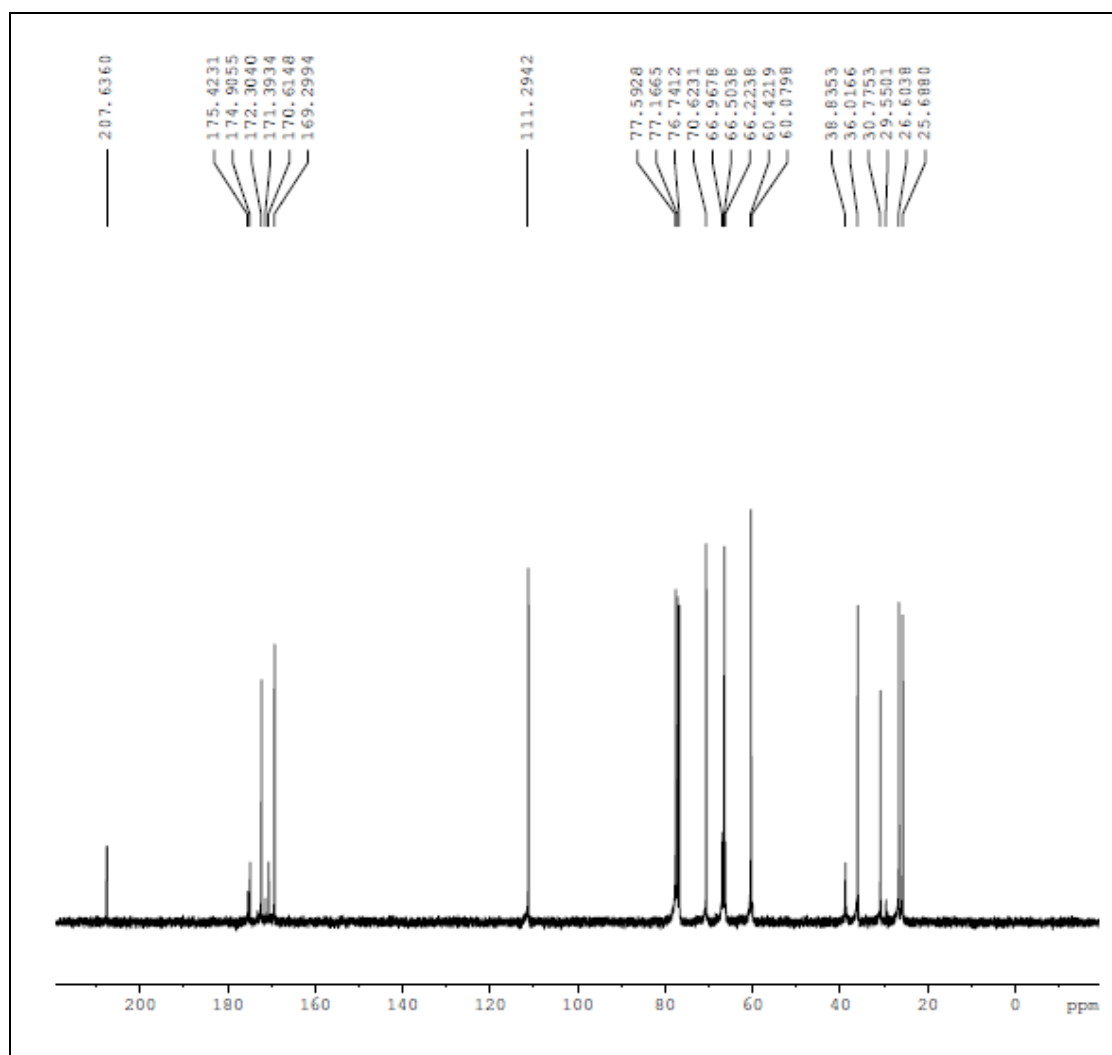
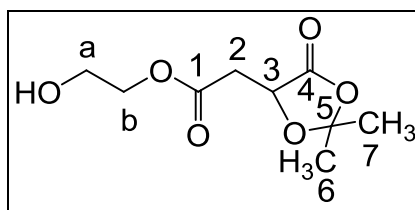
77 (CDCl<sub>3</sub>); 25,76 (C<sub>6</sub>); 26,71 (C<sub>7</sub>); 36,02 (C<sub>2</sub>); 62,47 (C<sub>a</sub> e C<sub>b</sub>); 70,49 (C<sub>5</sub>);  
111,14 (C<sub>3</sub>); 168,90 (C<sub>1</sub>); 171,83 (C<sub>4</sub>)



**Espectro 28.** RMN  $^1\text{H}$  do intermediário IB com uma ramificação obtido utilizando EDC (experimento B2). Software: MestreC 4.7.

### RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ), 300 MHz, $\delta = \text{ppm}$

7,28 ( $\text{CDCl}_3$ ); 1,49, 1,54 (s, 6H,  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$ ); 2,82 (ddd, 2H,  $\text{H}_4$ ,  $J = 4,5 \text{ Hz}$ ,  $J = 16,95 \text{ Hz}$ ,  $J = 5,7 \text{ Hz}$ ,  $J = 16,95 \text{ Hz}$ ); 3,73 (t, 2H,  $\text{H}_5$ ,  $J = 4,3 \text{ Hz}$ ); 4,17 (m, 2H,  $\text{H}_6$ ); 4,7 (dd, 1H,  $\text{H}_3$ ,  $J = 4,5 \text{ Hz}$ ,  $J = 5,9 \text{ Hz}$ )



**Espectro 29.** RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário IB com uma ramificação obtido utilizando EDC (experimento B2). Software: MestreC 4.7.

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), 75 MHz,  $\delta = \text{ppm}$**

77,18 ( $\text{CDCl}_3$ ); 26,15 ( $\text{C}_6$ ); 30,16 ( $\text{C}_7$ ); 36,02 ( $\text{C}_2$ ); 66,56 ( $\text{C}_a$ ); 60,25 ( $\text{C}_b$ ); 70,62 ( $\text{C}_5$ ); 111,30 ( $\text{C}_3$ ); 168,29 ( $\text{C}_1$ ); 171,39 ( $\text{C}_4$ )

➤ Método C: método utilizando CDI como agente condensante (adaptado de AL-MASRI et al., 2012)

Diante da disponibilidade de reagentes no laboratório, o método com CDI foi desenvolvido como alternativa ao método anterior utilizando EDC para a síntese do intermediário IB. Apesar dos resultados insatisfatórios obtidos para a síntese do intermediário IA como esse agente condensante, a possibilidade de obtenção de produtos de purificação facilitada, assim como para o método com EDC, foi determinante para a escolha desse reagente.

A proporção molar utilizada no método C foi de 1:2 de etilenoglicol e ácido málico protegido, respectivamente. Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada em fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v) mostrou a formação de duas manchas com valores de  $R_f$  diferentes do ácido málico protegido e com comportamento semelhante ao obtido pelo método B, indicando a formação do intermediário IB com uma e duas substituições ( $R_f$  de 0,42 e 0,76, respectivamente).

O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 30) e o RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 31) apresentaram-se semelhantes aos espectros obtidos pelo método com EDC (método B). Além dos sinais do ácido málico protegido, extensamente discutidos nesse trabalho, os sinais dos hidrogênios do etilenoglicol podem ser observados entre 3,66 e 3,69 ppm, e entre 4,11 e 4,14 ppm para o derivado monossustituído ( $\text{H}_5$  e  $\text{H}_6$ , respectivamente), e em 4,23 ppm para o derivado dissustituído ( $\text{H}_{5'}$  e  $\text{H}_{6'}$ ). Os sinais dos carbonos do foco central estão localizados em 60,28 ppm ( $\text{C}_b$ ) e 66,49 ppm ( $\text{C}_a$ ) para o intermediário IB com uma ramificação e 62,42 ppm ( $\text{C}_{a'}$  e  $\text{C}_{b'}$ ) para o intermediário IB com duas ramificações. Dessa maneira, o produto obtido por esse método foi purificado por coluna cromatográfica, utilizando hexano/acetato de etila em gradiente de concentração, nas mesmas proporções utilizadas para o método anterior.

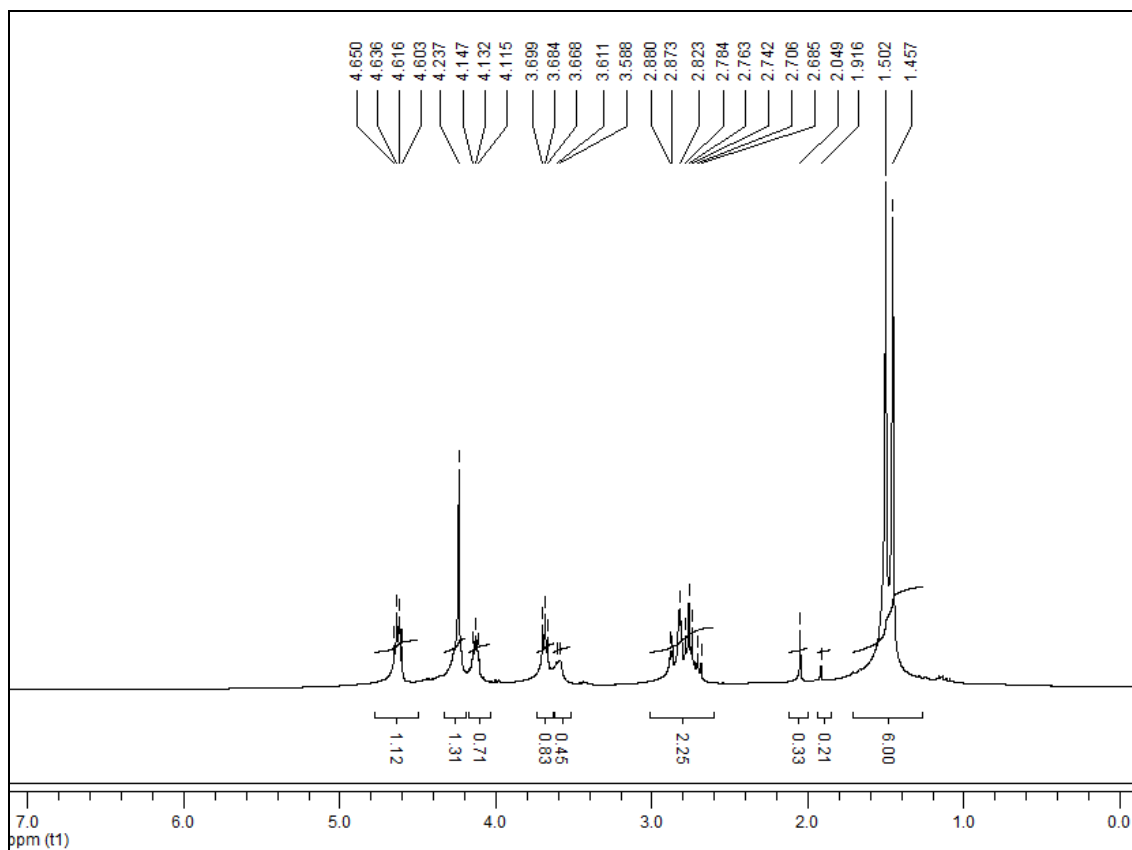
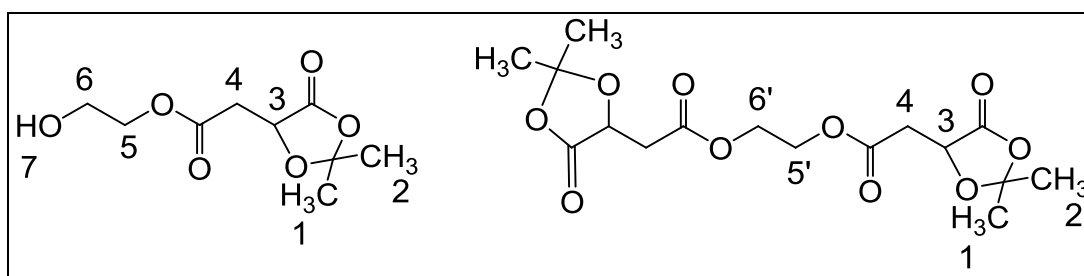
Os sinais entre 0,64 e 0,80 ppm correspondem à provável contaminação pelo óleo da bomba de alto vácuo utilizada para armazenar o produto, uma vez que estes sinais não apareceram no espectro do produto impuro. O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 32) da primeira fração isolada, correspondente ao  $R_f$  de 0,76, apresentou sinais referentes formação do intermediário IB com duas substituições. No espectro, é possível observar sinais do ácido málico

protegido já discutidos anteriormente, em adição ao singlete em 4,27 ppm, correspondente aos hidrogênios do foco central ( $H_5'$  e  $H_6'$ ), confirmando a obtenção do produto de interesse com duas ramificações.

O RMN de  $^1H$  (Espectro 33) da segunda fração, com  $R_f$  de 0,42, mostrou sinais da formação do intermediário IB com uma ramificação. O espectro apresentou sinais 3,57 ppm e em 4,01 ppm, relacionados aos hidrogênios do etilenoglicol ( $H_5$  e  $H_6$ , respectivamente) do intermediário IB com uma ramificação. Ademais, os sinais do ácido málico protegido também estão presentes. Portanto, assim como o método com EDC, o método com CDI também foi eficiente na obtenção do composto de interesse.

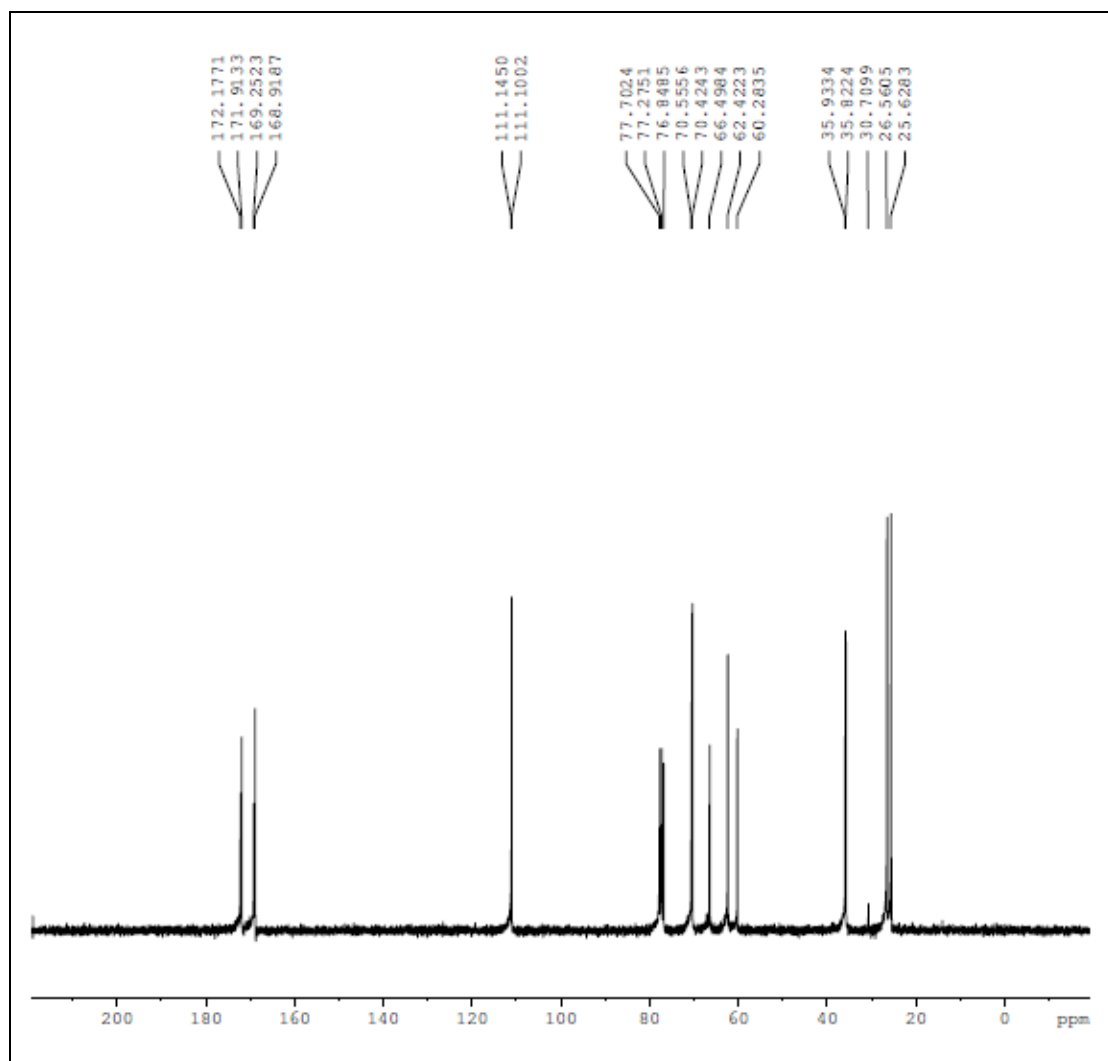
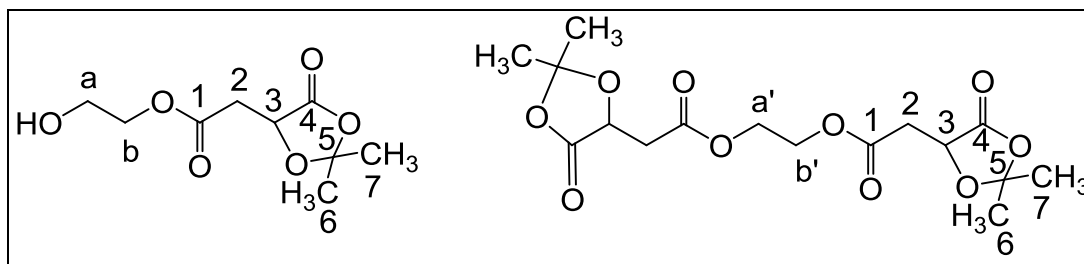
Vale ressaltar que apesar do resultado satisfatório obtido com esse método na síntese do intermediário IB, o mesmo protocolo de síntese utilizado, descrito por Al-Masri e colaboradores (2012) foi aplicado para a síntese do intermediário IA (foco central de *mio*-inositol). Entretanto, este mesmo procedimento não foi eficiente na obtenção composto de interesse (resultados não mostrados).

Os produtos isolados apresentaram-se semelhantes aos produtos obtidos pelo método com EDC, apresentando-se como um óleo de cor amarelo claro e os rendimentos obtidos foram de 22% para o intermediário com uma ramificação e 29% para o intermediário com duas ramificações.

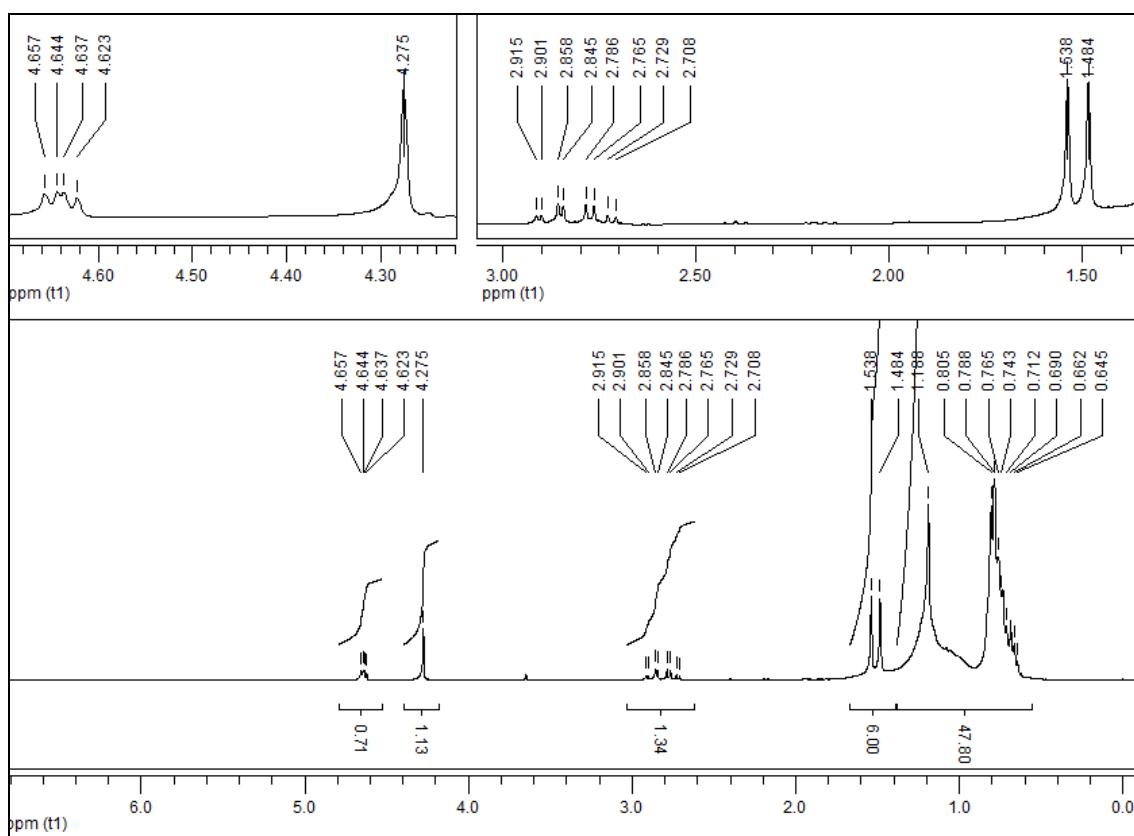
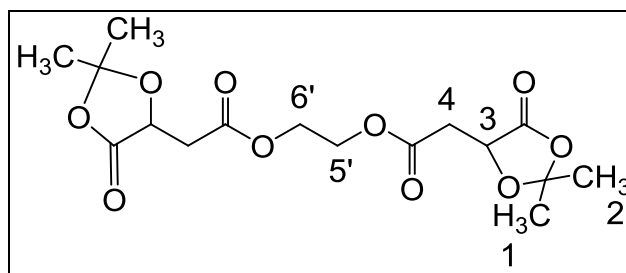


**Espectro 30.** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da reação de esterificação entre etilenoglicol e ácido málico protegido utilizando CDI (método C). *Software:* MestreC 4.7.

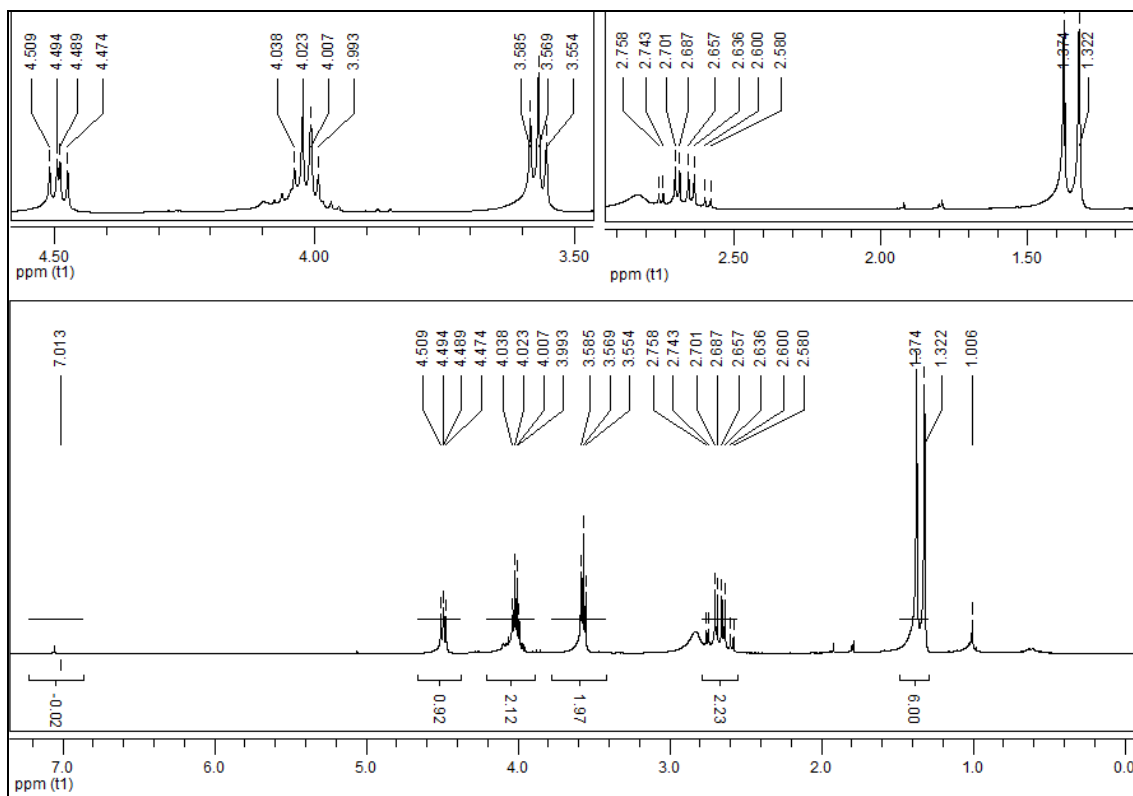
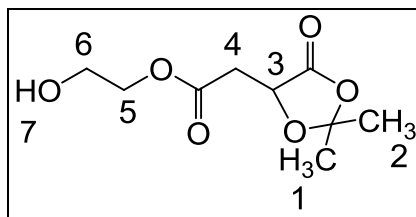




**Espectro 31.** RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de esterificação entre etilenoglicol e ácido málico protegido utilizando CDI (método C). *Software:* MestreC 4.7.



**Espectro 32.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do intermediário IB com duas ramificações obtido utilizando CDI (método C). *Software:* MestreC 4.7.



**Espectro 33.** RMN  $^1\text{H}$  do intermediário IB com uma ramificação obtido utilizando CDI (método C). *Software:* MestreC 4.7.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), 300 MHz,  $\delta = \text{ppm}$**

7,01 ( $\text{CDCl}_3$ ); 1,37, 1,32 (s, 6H,  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_2$ ); 2,67 (ddd, 2H,  $\text{H}_4$ ,  $J = 4,5 \text{ Hz}$ ,  $J = 16,95 \text{ Hz}$ ,  $J = 6,3 \text{ Hz}$ ,  $J = 16,95 \text{ Hz}$ ); 3,57 (t, 2H,  $\text{H}_5$ ,  $J = 4,7 \text{ Hz}$ ); 4,01 (m, 2H,  $\text{H}_6$ ); 4,5 (dd, 1H,  $\text{H}_3$ ,  $J = 4,5 \text{ Hz}$ ,  $J = 6 \text{ Hz}$ )

#### 4.1.2.3 Síntese do malato de etilenoglicol

Como o intermediário IB foi sintetizado com sucesso pelos métodos utilizando EDC ou CDI, partiu-se para a etapa de síntese do malato de etilenoglicol. Esse composto é obtido a partir da hidrólise da lactona do ácido málico protegido presente na estrutura do intermediário IB. A desproteção dessa lactona é importante, pois vai liberar a hidroxila e o ácido carboxílico presente nessa estrutura, permitindo o crescimento da malha dendrímica, bem como a ligação do espaçante aos fármacos envolvidos no dendrímero.

Para a obtenção do malato de inositol utilizaram-se como materiais de partida os compostos obtidos com uma ramificação (1RAM) e com duas ramificações (2RAM), utilizando EDC ou CDI como agentes de acoplamento. A reação de desproteção foi realizada por dois métodos distintos: o método A, adaptado de Mantell (2007), que utiliza solução aquosa de ácido clorídrico e acetonitrila em proporção molar de 1:1; e o método B, adaptado de Damen e colaboradores (2000), que utiliza ácido acético, THF e água.

Para o método A, realizaram-se três variações com diferentes concentrações molares da solução de ácido clorídrico. No experimento A1, utilizando como material de partida o intermediário IB com 1RAM, empregou-se solução aquosa de ácido clorídrico 1 M. Após 3 horas de reação, a cromatografia em camada delgada em fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v) mostrou a formação de mancha mais polar em relação ao material de partida, com  $R_f$  de 0,1, sugerindo a hidrólise da lactona. Resultado semelhante foi observado para os experimentos A2 e A3, que partiram do intermediário IB com 2RAM e que empregaram solução aquosa de ácido clorídrico 0,5 M e 0,1 M, respectivamente.

Apesar dos indícios da obtenção do malato de etilenoglicol, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  não foram satisfatórios. O RMN de  $^1\text{H}$  do experimento A1 (Espectro 34) apresentou sinais dos hidrogênios do etilenoglicol entre 3,78 e 3,81 ppm ( $\text{H}_5$ ) e entre 4,14 e 4,17 ppm ( $\text{H}_6$ ), porém em baixa intensidade. Os sinais do  $\text{H}_4$  do espaçante podem ser observados entre 2,84 e 2,97 ppm, entretanto, os sinais do  $\text{H}_3$  e os sinais dos hidrogênios metílicos da proteção estão ausentes no espectro ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ). Esse resultado indica que, além da

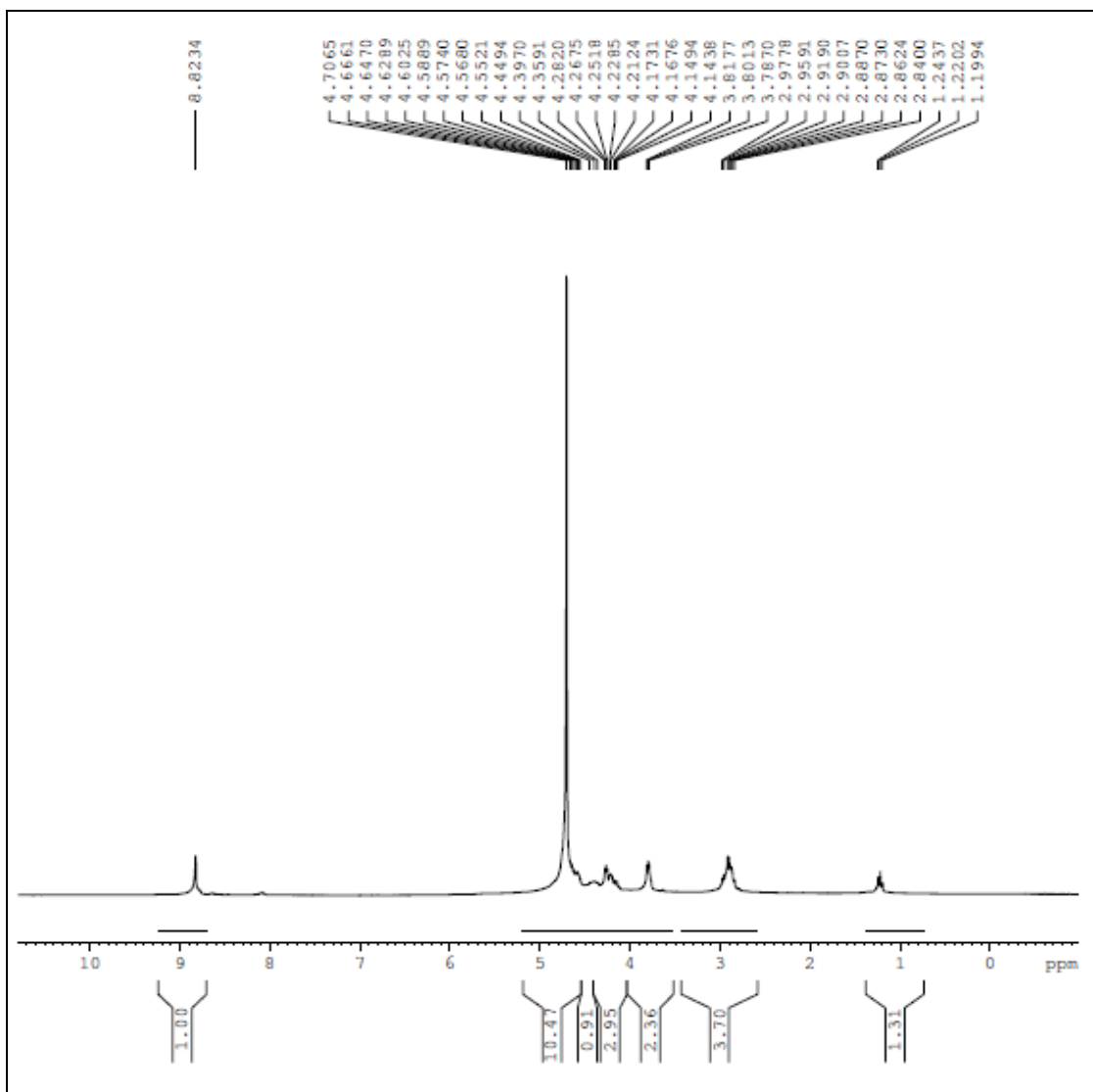
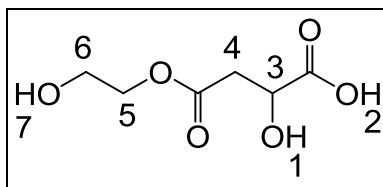
hidrólise da lactona, houve hidrólise da ligação éster entre o espaçante e o foco central.

O espectro do experimento A2 (Espectro 35) apresentou somente sinais referentes ao acetato de etila, solvente utilizado no tratamento da reação, Portanto, o experimento A2 não foi satisfatório assim como o experimento A3 (Espectro 36), que também não apresentou sinais relativos ao produto desejado, tampouco do material de partida utilizado. Dessa maneira, os métodos que empregaram solução aquosa de ácido clorídrico não foram eficientes na obtenção do malato de etilenoglicol.

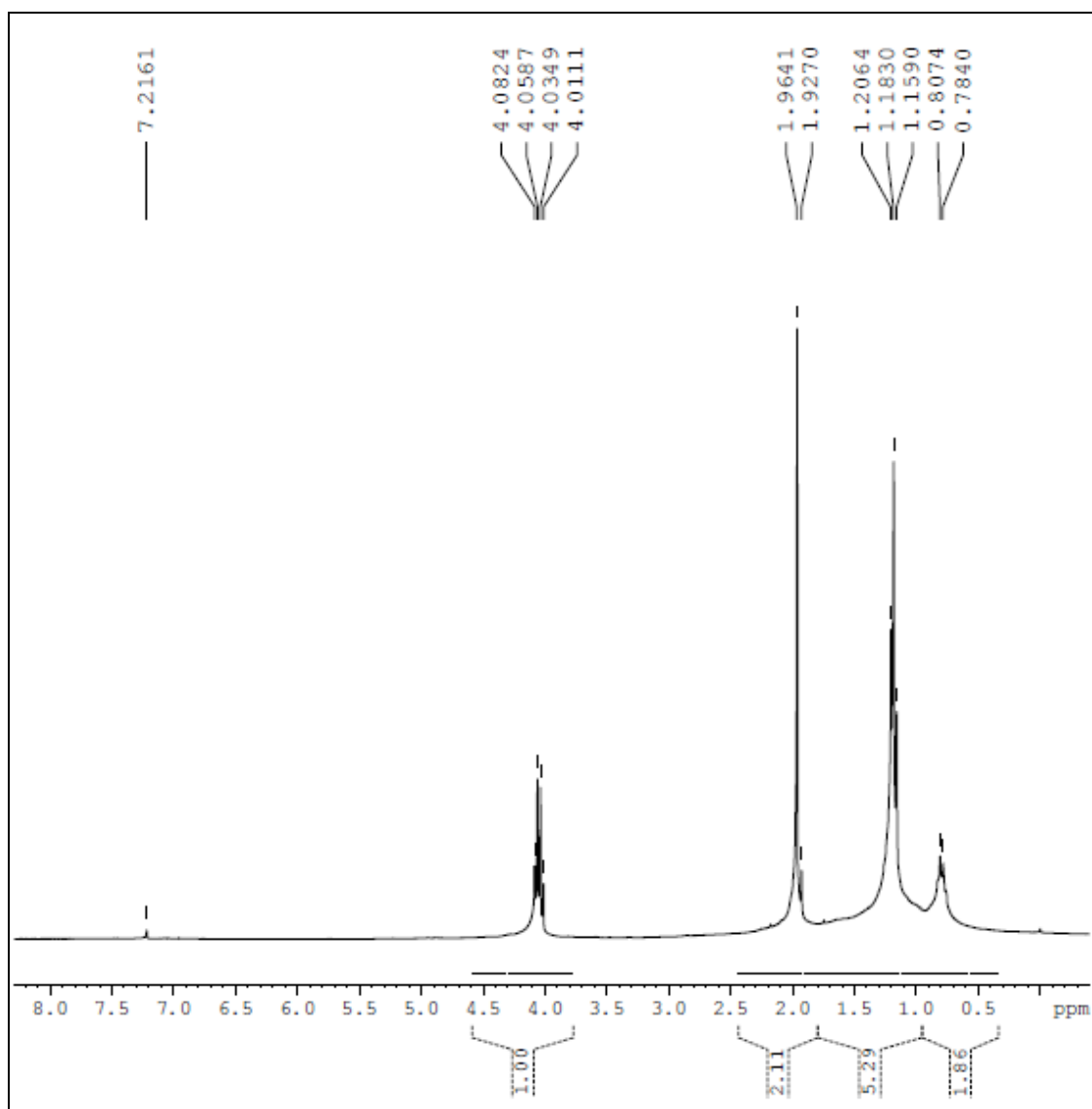
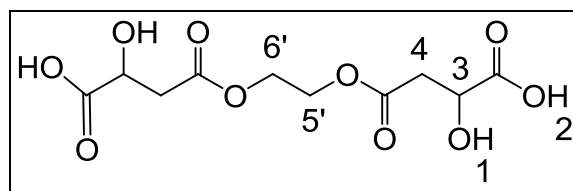
Para o método B, realizaram-se duas variações de síntese: o experimento B1, que utiliza ácido acético, THF e água, na proporção de 1:1:1 (v/v/v) e como material de partida o intermediário com IB com 1RAM; e o método B2, que utiliza os mesmos reagentes/solventes, entretanto na proporção de 4:1:2 (v/v/v) e utilizando como material de partida o intermediário IB com 2RAM.

Após 2 horas de reação, a cromatografia em camada delgada do produto do experimento B1 em fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v), mostrou a formação de a mancha com  $R_f$  de 0,34, mais polar em relação ao material de partida, que tem  $R_f$  de 0,42. No entanto, o RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 37) indica que não houve hidrólise da proteção do intermediário IB, pelos sinais em 1,48 e 1,53 ppm, correspondentes aos hidrogênios metílicos da lactona ( $\text{H}_1$  e  $\text{H}_2$ ). Em adição, apesar do excesso de sinais do espectro, é possível identificar os sinais já discutidos anteriormente para o intermediário IB de 1RAM. Portanto, esse experimento não foi eficiente na obtenção do malato de etilenoglicol.

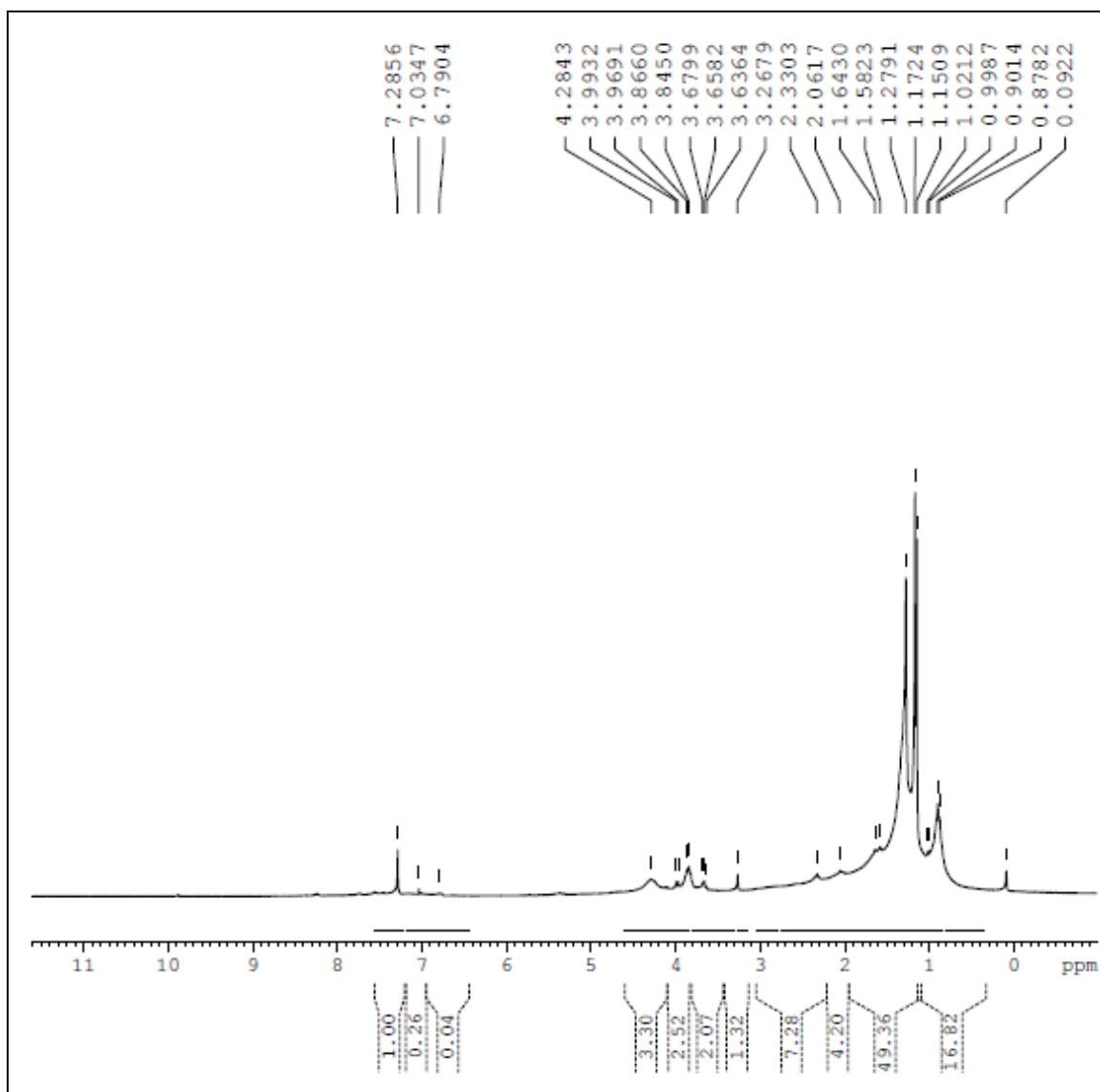
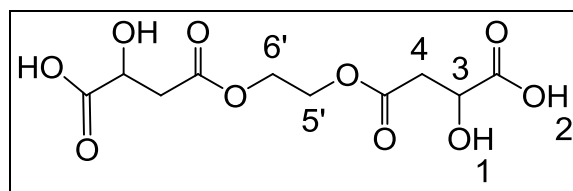
O experimento B2 também não apresentou resultado satisfatório. Após 3 horas de reação, a cromatografia em camada delgada em fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v) mostrou a formação de mancha mais polar em relação ao material de partida, com  $R_f$  de 0,12. Entretanto, o RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 38), semelhante ao correspondente ao método A, não apresentou sinais relativos ao produto de interesse. Dessa maneira, nenhum dos métodos estudados foi eficiente na síntese do malato de etilenoglicol.



**Espectro 34.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) da reação de obtenção do malato de etilenoglicol utilizando HCl 1 M (experimento A1).

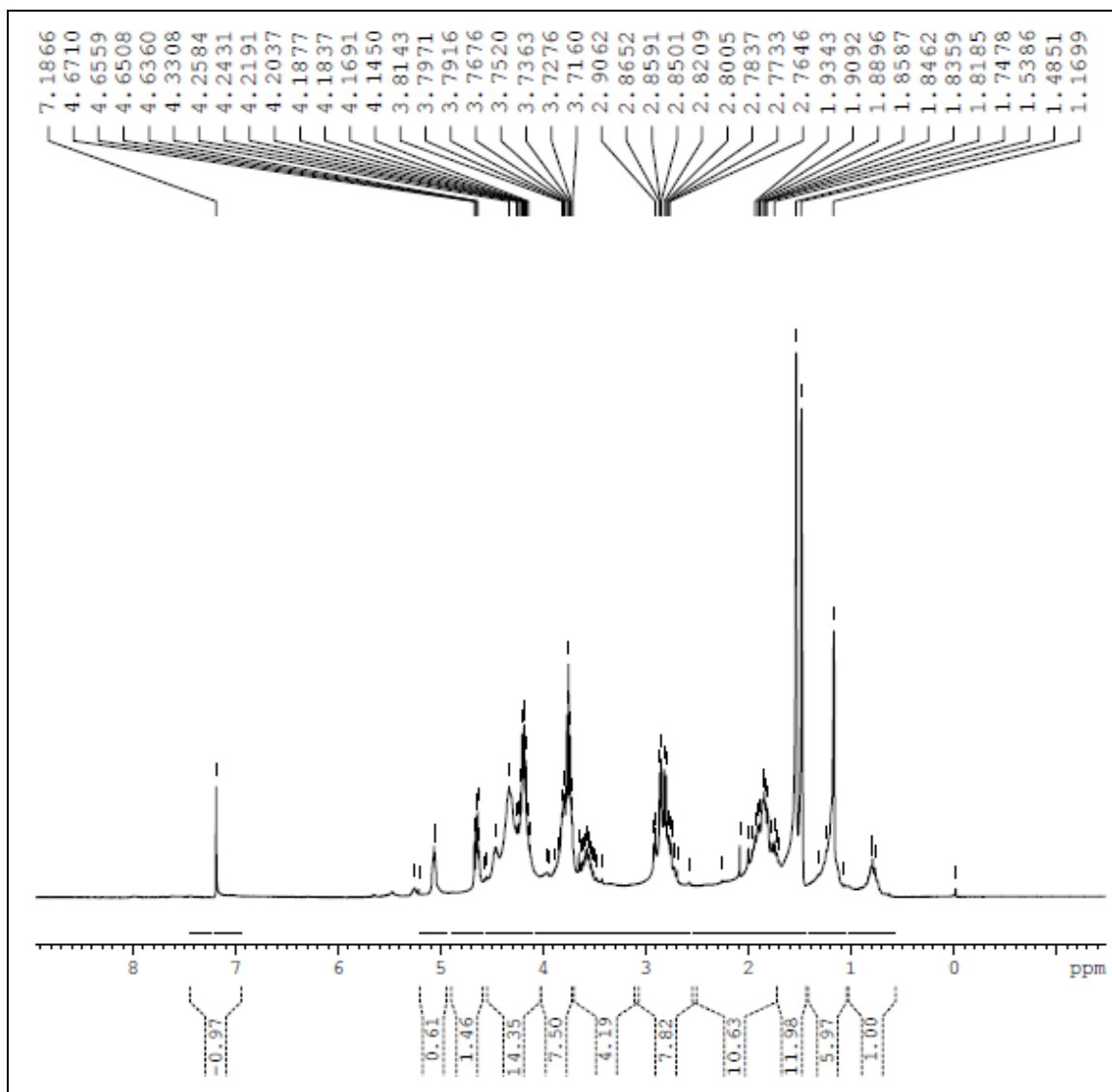
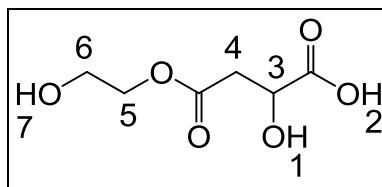


**Espectro 35.** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da reação de obtenção do malato de etilenoglicol utilizando HCl 0,5 M (experimento A2).

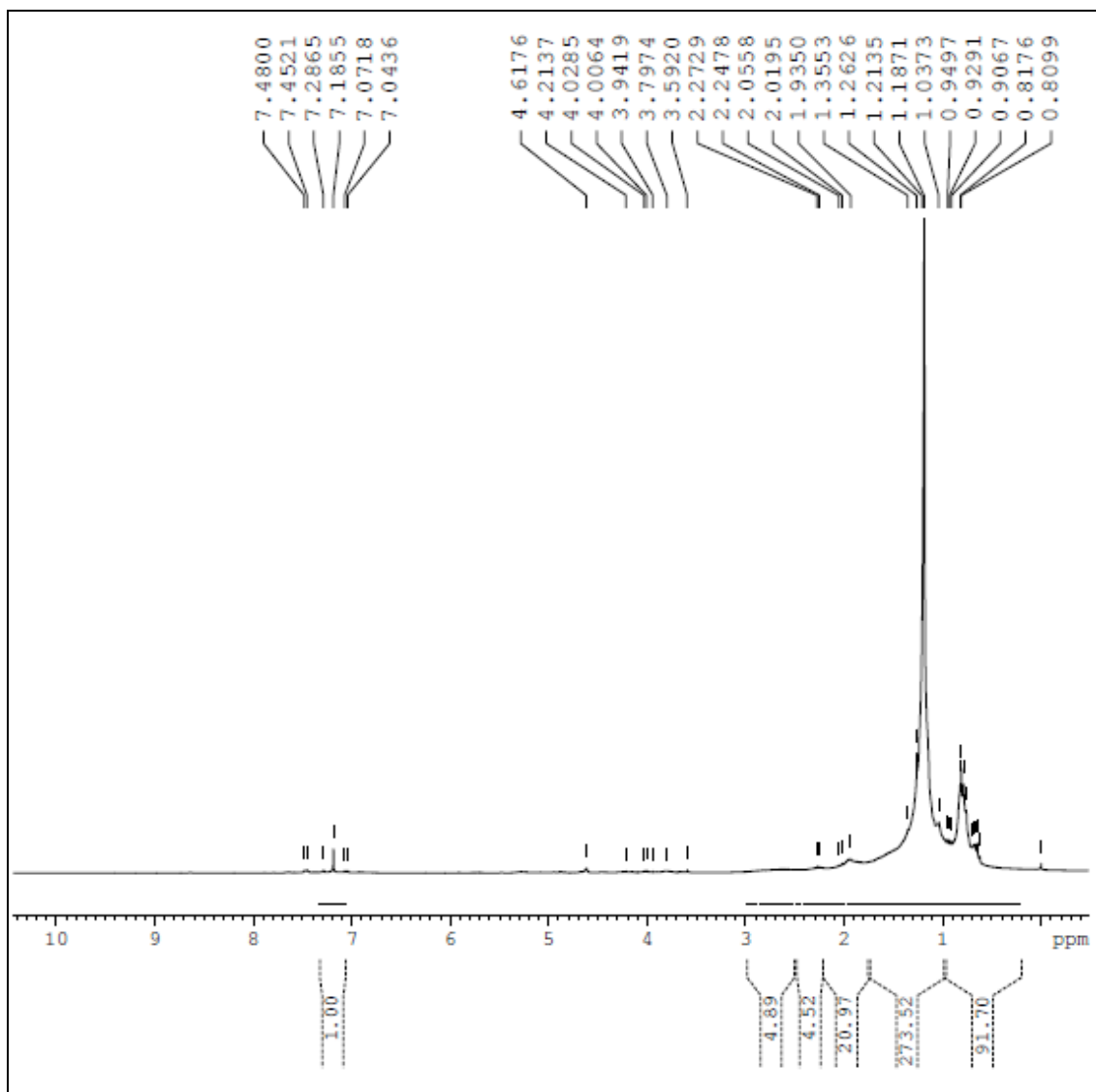
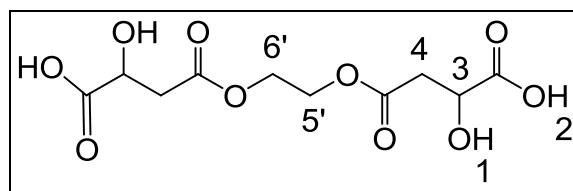


**Espectro 36.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de obtenção do malato de etilenoglicol utilizando HCl 0,1 M (experimento A3).





**Espectro 37.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da reação de obtenção do malato de etilenoglicol utilizando ácido acético, THF e água 1:1:1 (v/v/v) experimento B1).



**Espectro 38.** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da reação de obtenção do malato de etilenoglicol utilizando ácido acético, THF e água 4:1:2 (v/v/v) (experimento B2).

#### 4.1.2.4 Síntese do intermediário II

➤ Método A: método utilizando DCC como agente condensante (adaptado de DAMEN et al., 2000)

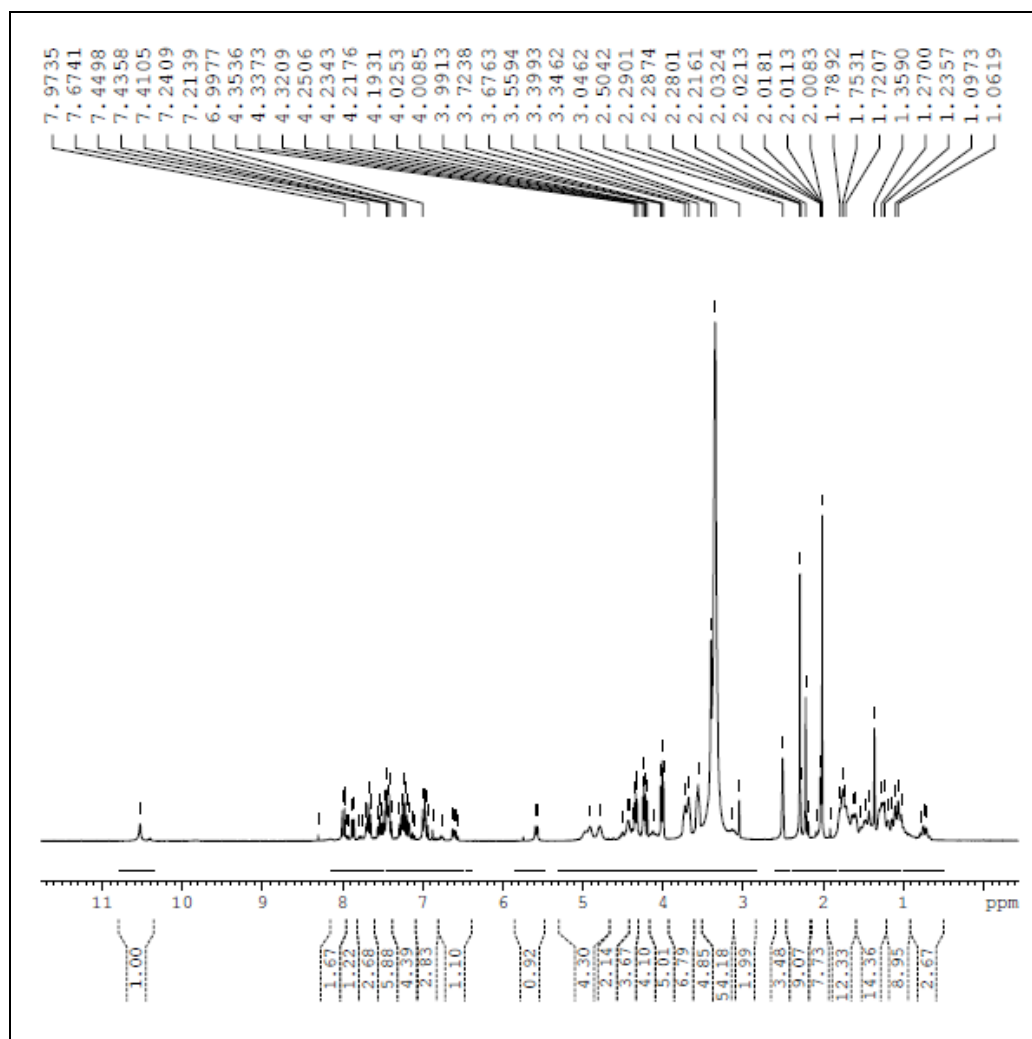
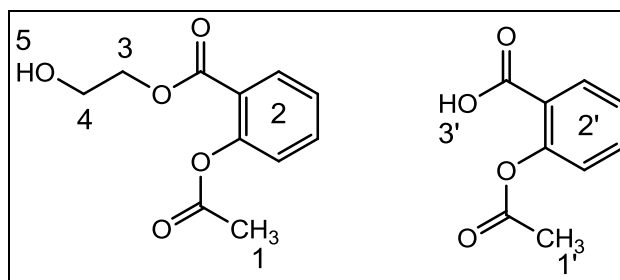
No método A, utilizou-se DCC como agente condensante e DMAP como catalisador da reação. Optou-se inicialmente por essa metodologia, pois como discutido anteriormente, o DCC é amplamente utilizado em reações de condensação, apesar da dificuldade de remoção do DCU. A proporção molar utilizada entre o AAS e o etilenoglicol foi de 1:2, respectivamente.

Após 24 horas de reação, a mancha do AAS ( $R_f$  de 0,30) desapareceu da placa cromatográfica com fase móvel clorofórmio/metanol 2:1 (v/v), indicando que o material de partida foi consumido na reação. Em adição, a placa de cromatografia em camada delgada mostrou três manchas com diferentes valores de  $R_f$ . A mancha mais polar, com  $R_f$  de 0,25, é referente ao material de partida etilenoglicol. As demais manchas com  $R_f$  de 0,60 e 0,95 podem estar relacionada ao DCU e ao produto de interesse, nesta ordem.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 39) mostrou excesso de sinais que estão relacionados ao DCU, produto secundário da reação. Apesar das impurezas, é possível identificar o singlete em 2,21 ppm, característico dos hidrogênios do grupo acetila ( $\text{H}_1$ ) do AAS, além dos sinais entre 6,99 e 7,97 ppm ( $\text{H}_2$ ), que representam os hidrogênios do anel aromático *orto*-dissubstituído desse fármaco. Nesta última região, os sinais do catalisador utilizado na reação (DMAP) também estão presentes. Já os sinais entre 3,72 e 4,35 ppm podem estar relacionados ao hidrogênios do etilenoglicol do intermediário II ( $\text{H}_3$  e  $\text{H}_4$ ), indicando a possível obtenção do produto. Entretanto, o sinal em 10,5 ppm, referente ao próton do ácido carboxílico do AAS ( $\text{H}_3$ ), indica que pode haver mistura entre o intermediário II e o fármaco, além do DCU e do DMAP.

Portanto, apesar dos indícios da sua obtenção, o produto apresentou-se bastante impuro. Neste caso, considerou-se a dificuldade de purificação dos compostos obtidos com DCC (intermediário IA) e optou-se por buscar métodos

alternativos, que pudessem resultar em reações mais limpas e de fácil purificação. Esses métodos serão discutidos na sequência.



**Espectro 39.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO  $\text{d}_6$ ) da esterificação entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol utilizando DCC (Método A).

➤ Método B: método do anidrido misto (adaptado de VARGAS, 2007)

- Experimento B1: método utilizando cloroformato de etila

O experimento B1 empregou cloroformato de etila como agente condensante e *N*-metilmorfolina como catalisador para a síntese do intermediário II. O objetivo desse método foi obter o produto com menos impurezas em relação ao método anterior. A proporção molar utilizada entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol foi de 1:2, respectivamente.

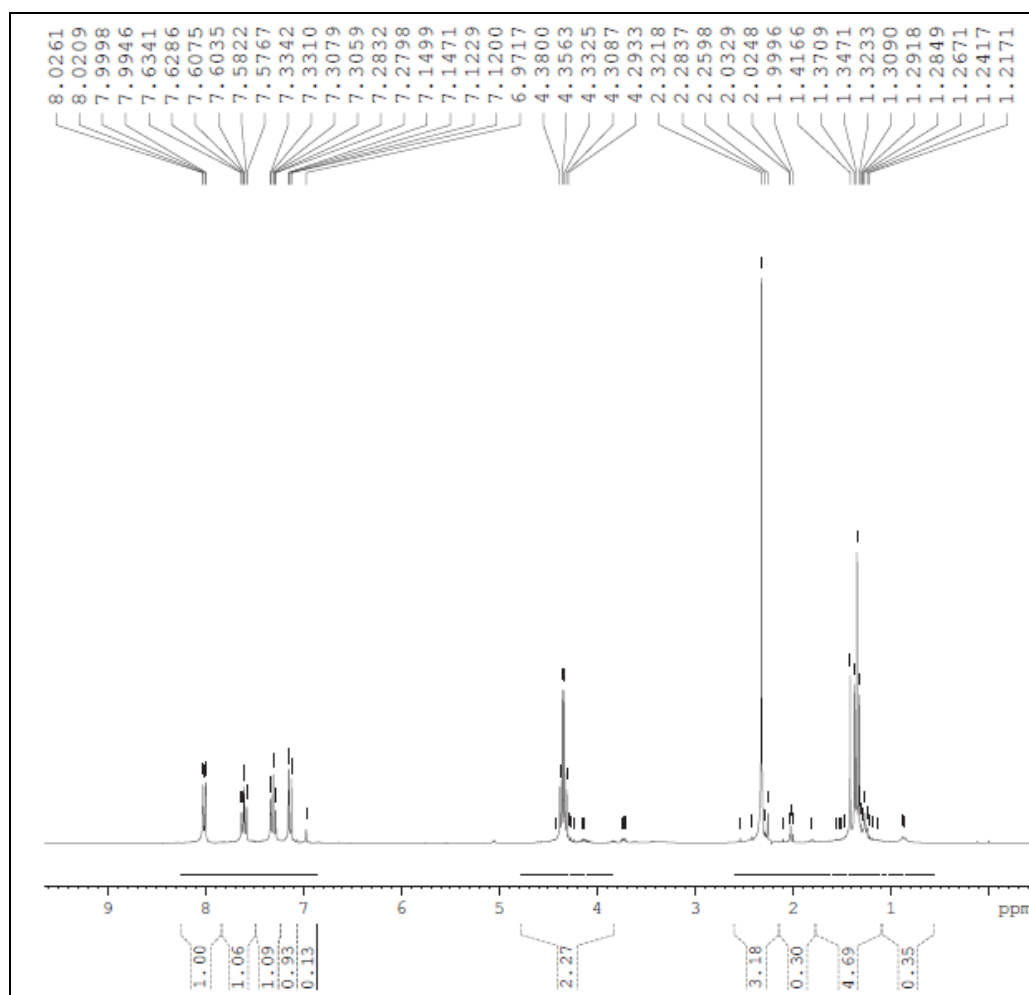
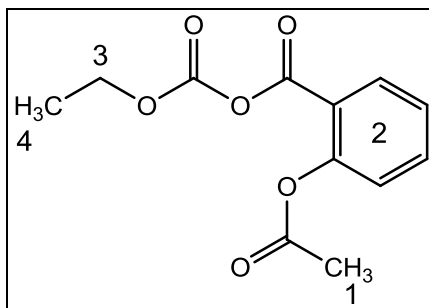
Após 72 horas de reação, a placa de cromatografia em camada delgada em fase móvel clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) mostrou a formação de um produto mais apolar (*R<sub>f</sub>* de 0,6) em relação ao ácido acetilsalicílico (*R<sub>f</sub>* de 0,3), o que é desejado.

Entretanto, o RMN de <sup>1</sup>H (Espectro 40) não apresentou sinais da obtenção do intermediário II. No espectro, é possível observar a formação do anidrido misto entre o cloroformato de etila e o AAS, assim como foi observado na síntese dos demais intermediários do dendrímero que empregaram processo sintético semelhante. A formação do anidrido misto pode ser confirmada pela presença de sinais entre 4,29 e 4,38 ppm (H<sub>3</sub>) e entre 1,21 e 1,41 ppm (H<sub>4</sub>), relativos aos hidrogênios do agente condensante. Em adição, é possível identificar os sinais entre 7,12 e 8,02 ppm (H<sub>2</sub>) e o singlete em 2,32 ppm (H<sub>3</sub>), referentes ao anel aromático e aos hidrogênios do grupo acetila do AAS, respectivamente.

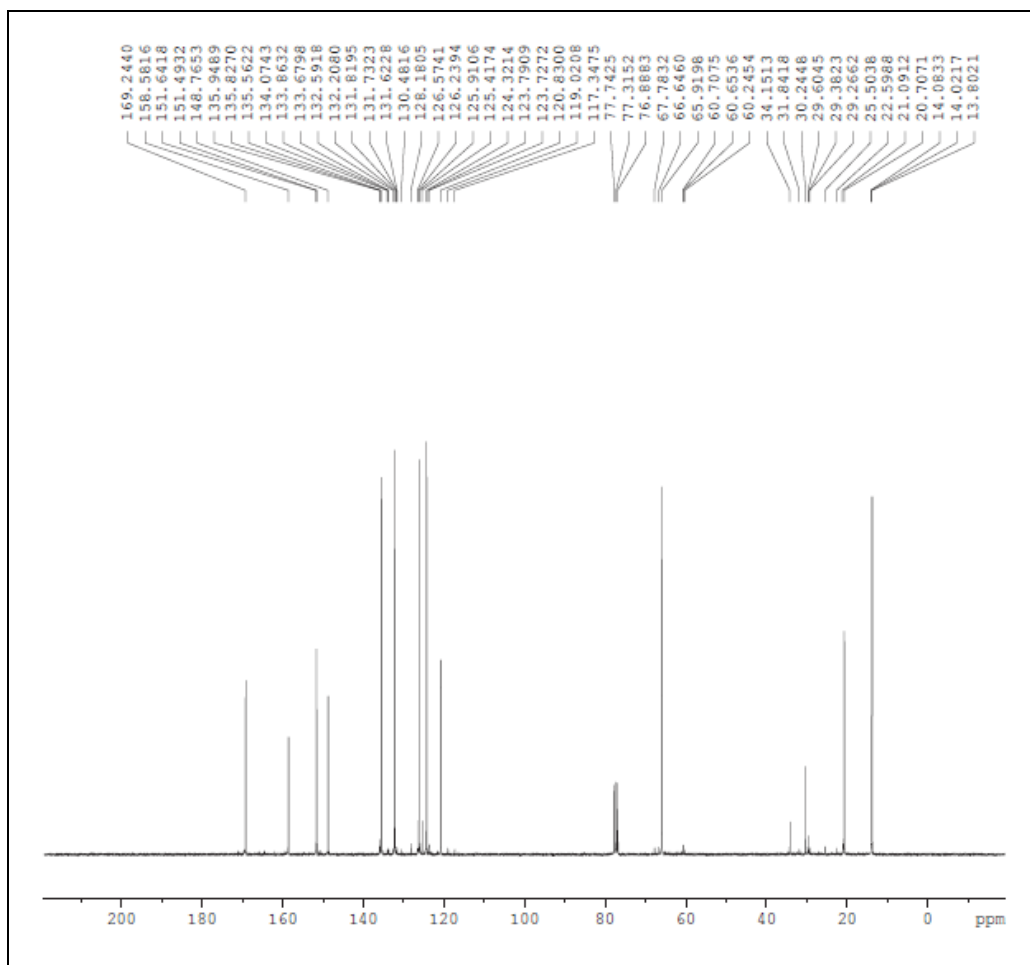
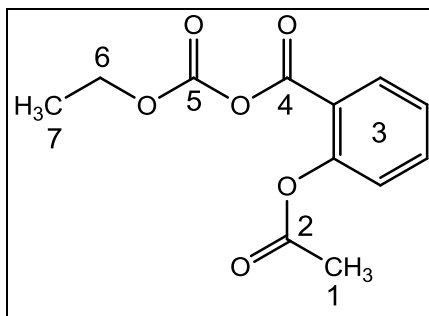
O RMN de <sup>13</sup>C (Espectro 41) evidencia a formação do anidrido misto pela presença dos sinais dos carbonos do agente condensante em 14,02 ppm (C<sub>7</sub>) e 60,70 ppm (C<sub>6</sub>), além dos sinais das carbonilas do anidrido em 148,76 ppm (C<sub>5</sub>) e 158,58 ppm (C<sub>4</sub>). Os demais sinais observados no espectro correspondem ao AAS, localizados entre 120 e 140 ppm e em 151,49 ppm, correspondentes aos carbonos do anel aromático (C<sub>3</sub>), além do sinal em 21,09 ppm (C<sub>1</sub>) e 169,24 ppm (C<sub>2</sub>), relativos ao carbono metílico e carbonílico, nesta ordem.

Nota-se que apesar de não apresentar o intermediário de interesse, o espectro apresenta-se mais limpo em relação ao método anterior utilizando

DCC como agente condensante. Dessa maneira, optou-se por continuar estudando o método do anidrido misto, porém, buscando novas alternativas para esse tipo de reação.



**Espectro 40.** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da esterificação entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol utilizando cloroformato de etila (experimento B1).



**Espectro 41.** RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da esterificação entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol utilizando cloroformato de etila (experimento B1).

- Experimento B2: método utilizando 4-nitrofenilcloroformato

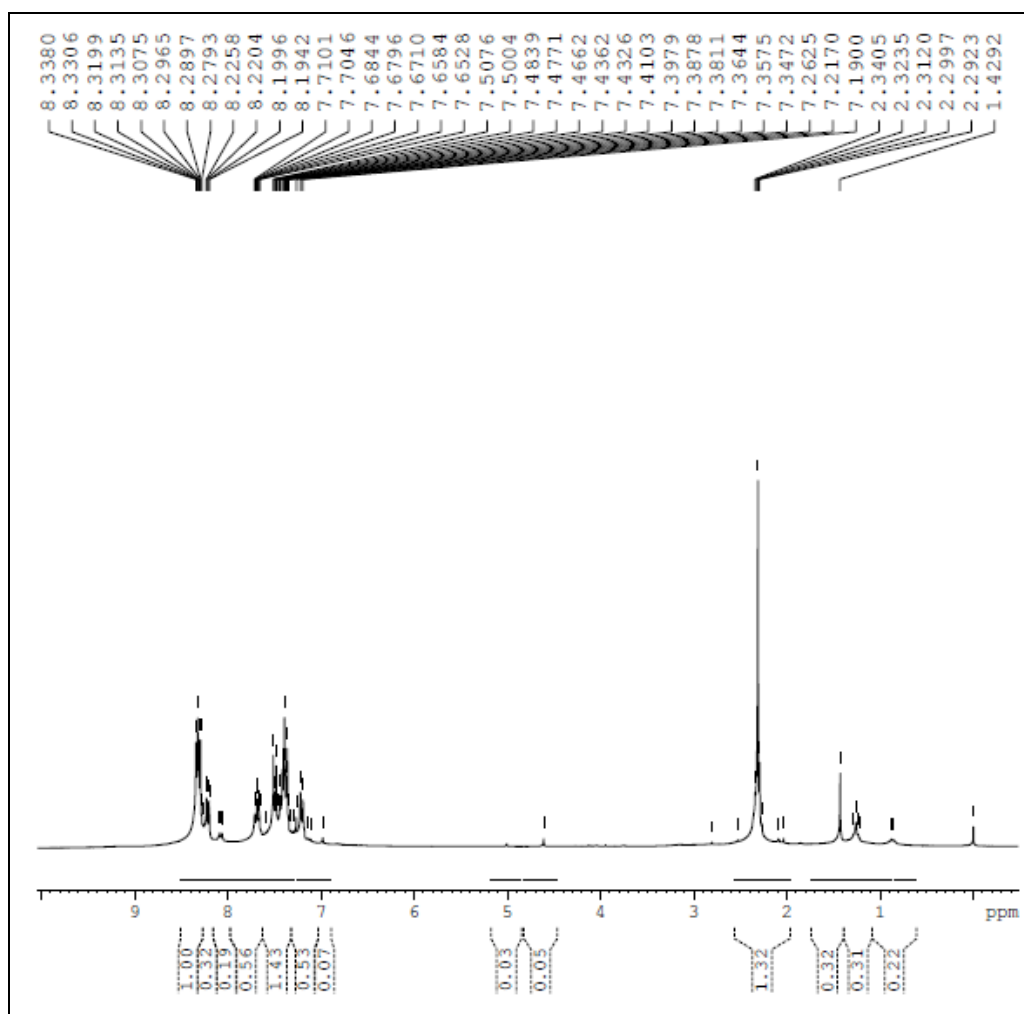
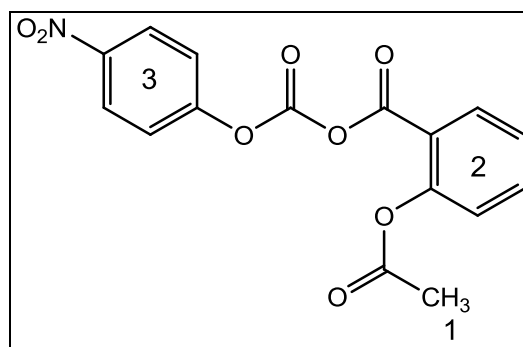
Como a reação com cloroformato de etila gerou um anidrido misto estável frente ao ataque nucleofílico do etilenoglicol, levando à não obtenção do intermediário II, propôs-se, para o experimento B2, utilizar o 4-nitrofenilcloroformato em substituição ao cloroformato e etila. O 4-nitrofenilcloroformato possui em sua estrutura um grupo nitrofenila, que se comporta como um melhor grupo de saída em relação ao etila do cloroformato de etila, o que pode favorecer o ataque nucleofílico do etilenoglicol ao anidrido misto e, conseqüentemente, a formação do intermediário desejado.

A proporção molar utilizada entre AAS e etilenoglicol foi de 1:2, respectivamente. Após 72 horas de reação, as placas de cromatografia em camada delgada na fase móvel clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) mostraram a formação de duas manchas com  $R_f$  de 0,78 e 0,9, sendo que a mancha mais apolar, de  $R_f$  0,9, pode estar relacionada ao produto esperado.

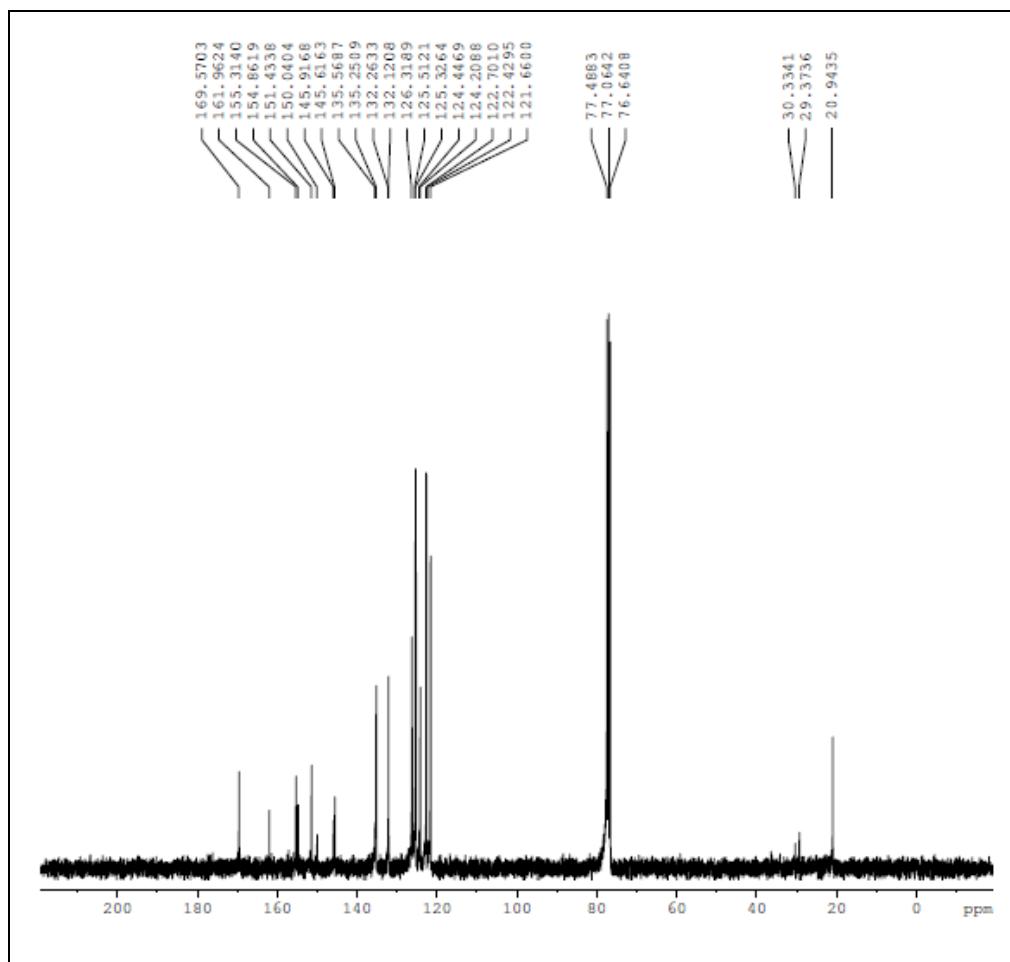
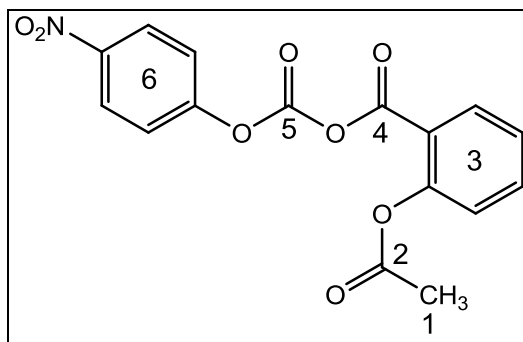
O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 42) apresentou sinais do AAS em 2,31 ppm ( $\text{H}_1$ ) e sinais entre 7 e 8 ppm, relativos aos hidrogênios do anel aromático ( $\text{H}_2$ ). Nesta última região, também é possível identificar os sinais do anel aromático do agente condensante em 7,34 e 8,28 ppm ( $\text{H}_3$ ), sugerindo a obtenção do anidrido misto. Esse resultado pode ser mais bem visualizado pelo RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 43). Nesse espectro é possível observar sinais das carbonilas do anidrido misto em 145,9 ppm ( $\text{C}_5$ ) e 151,4 ppm ( $\text{C}_4$ ). Os sinais dos carbonos da acetila do AAS estão presentes em 20,94 ppm ( $\text{C}_1$ ) e 169,57 ppm ( $\text{C}_2$ ) e entre 121,6 e 161,9 ppm ( $\text{C}_3$ ), com exceção dos sinais em 124,44 e 126,31 ppm, que correspondem aos carbonos do anel aromático do 4-nitrofenilcloroformato ( $\text{C}_6$ ).

Ao contrário do esperado, a utilização do 4-nitrofenilcloroformato não favoreceu o ataque nucleofílico do etilenoglicol e, assim como observado para o experimento B1, essa reação gerou um anidrido misto estável. Dessa maneira, com o objetivo de favorecer o ataque ao anidrido misto para a formação do intermediário II, optou-se por manter esse agente condensante, alterando as condições de reação.





**Espectro 42.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da esterificação entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol utilizando 4-nitrofenilclorofornato (experimento B2).



**Espectro 43.** RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da esterificação entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol utilizando 4-nitrofenilclorofornato (experimento B2).

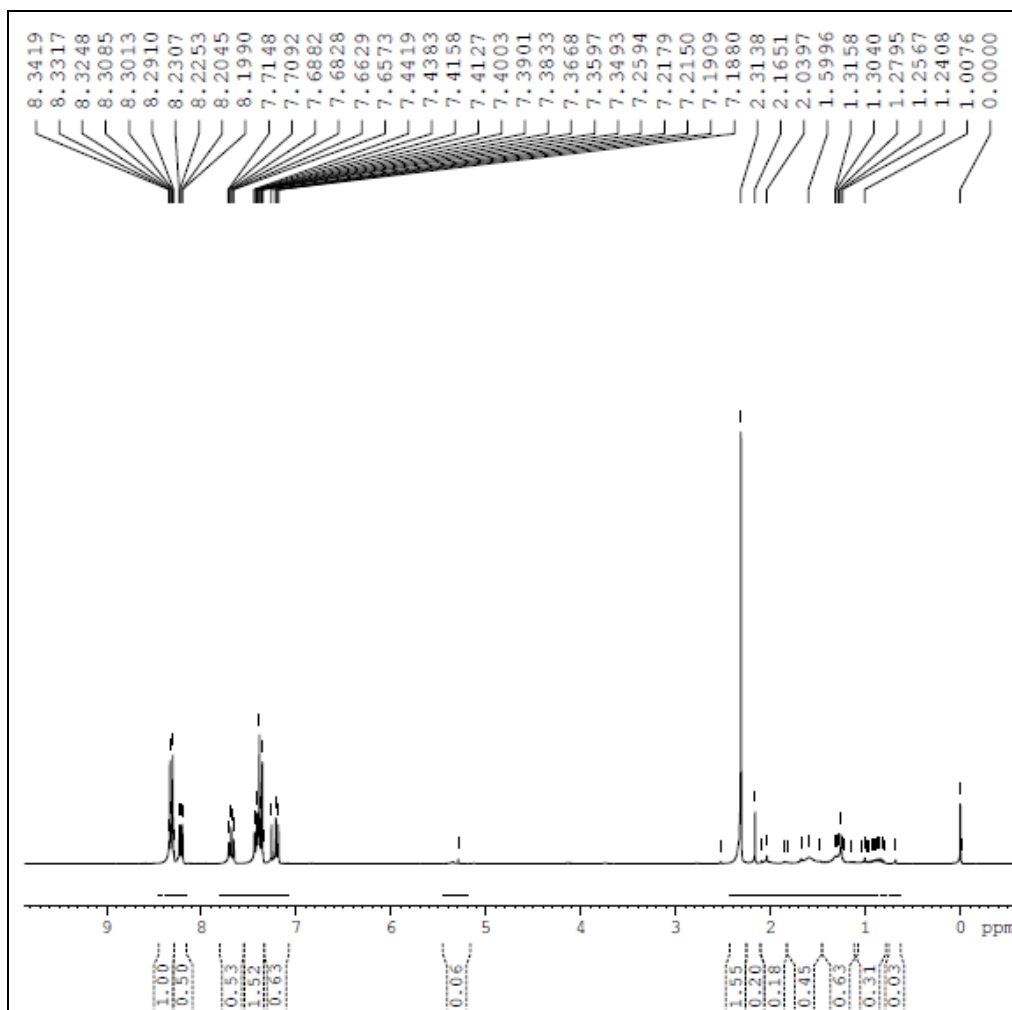
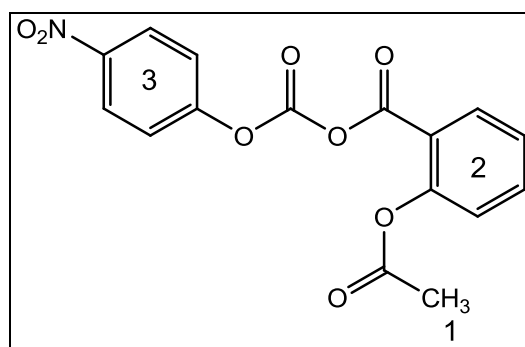
- Experimento B3: excesso do álcool e aquecimento a 60 °C

Para o experimento B3, alteraram-se as condições da reação a fim de favorecer o ataque nucleofílico do etilenoglicol ao anidrido misto. A reação foi, então, realizada a 60 °C, com excesso do álcool, sendo a proporção molar entre AAS e etilenoglicol de 1:10, respectivamente.

Após 50 horas de reação, a cromatografia em camada delgada na fase móvel clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) mostrou comportamento semelhante àquele obtido para o experimento B2, indicando a formação de duas manchas distintas com  $R_f$  0,75 e 0,9. Esse resultado sugere que houve novamente a formação do anidrido misto.

O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 44) também foi semelhante ao RMN de  $^1\text{H}$  do experimento anterior. O espectro apresentou sinais do AAS em 2,31 ppm ( $\text{H}_1$ ) e sinais entre 7 e 8 ppm, que correspondem aos hidrogênios do anel aromático ( $\text{H}_2$ ). Em adição, nesta última região também é possível observar os sinais dos hidrogênios do anel aromático do 4-nitrofenilcloroformato ( $\text{H}_3$ ).

Portanto, assim como os experimentos anteriores, que utilizaram cloroformatos, esse método não foi eficiente na obtenção do intermediário II nem mesmo com a modificação das condições reacionais.



**Espectro 44.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da esterificação entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol utilizando 4-nitrofenilclorofornato, excesso do álcool e aquecimento (experimento B3).

➤ Método C: método do cloreto de ácido

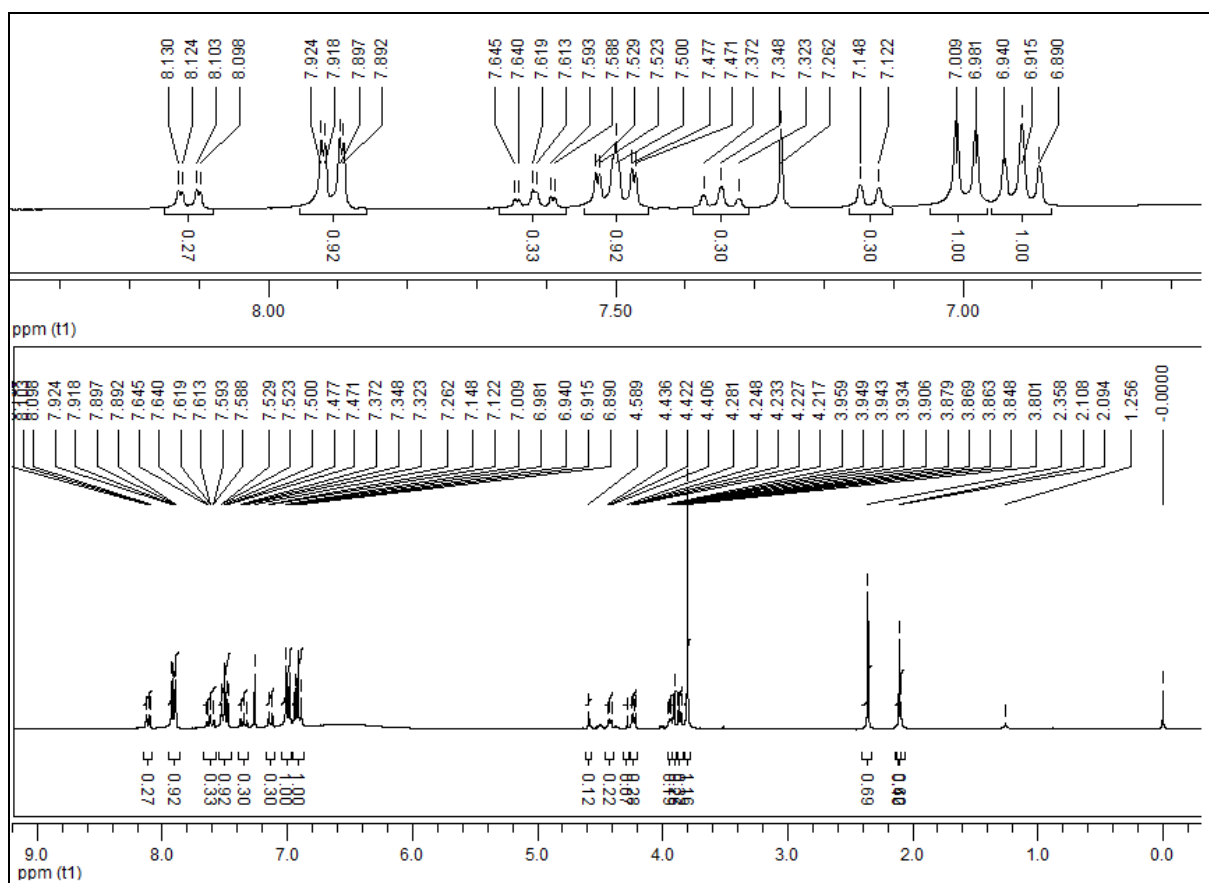
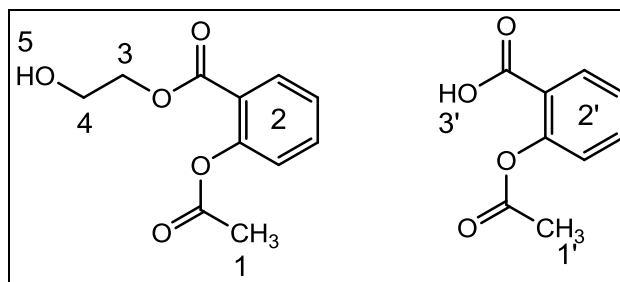
- Experimento C1: utilizando cloreto de oxalila (adaptado de MINEMOTO, 2006)

Diante da dificuldade da obtenção do intermediário II utilizando cloroformato de etila e 4-nitrofenilcloroformato como agentes condensantes, buscaram-se métodos alternativos de esterificação. O experimento C1 utilizou cloreto de oxalila, um agente clorante com mecanismo de ação semelhante ao cloreto de tionila, para a reação de condensação. A proporção molar utilizada entre AAS e etilenoglicol foi de 1:10,6, respectivamente.

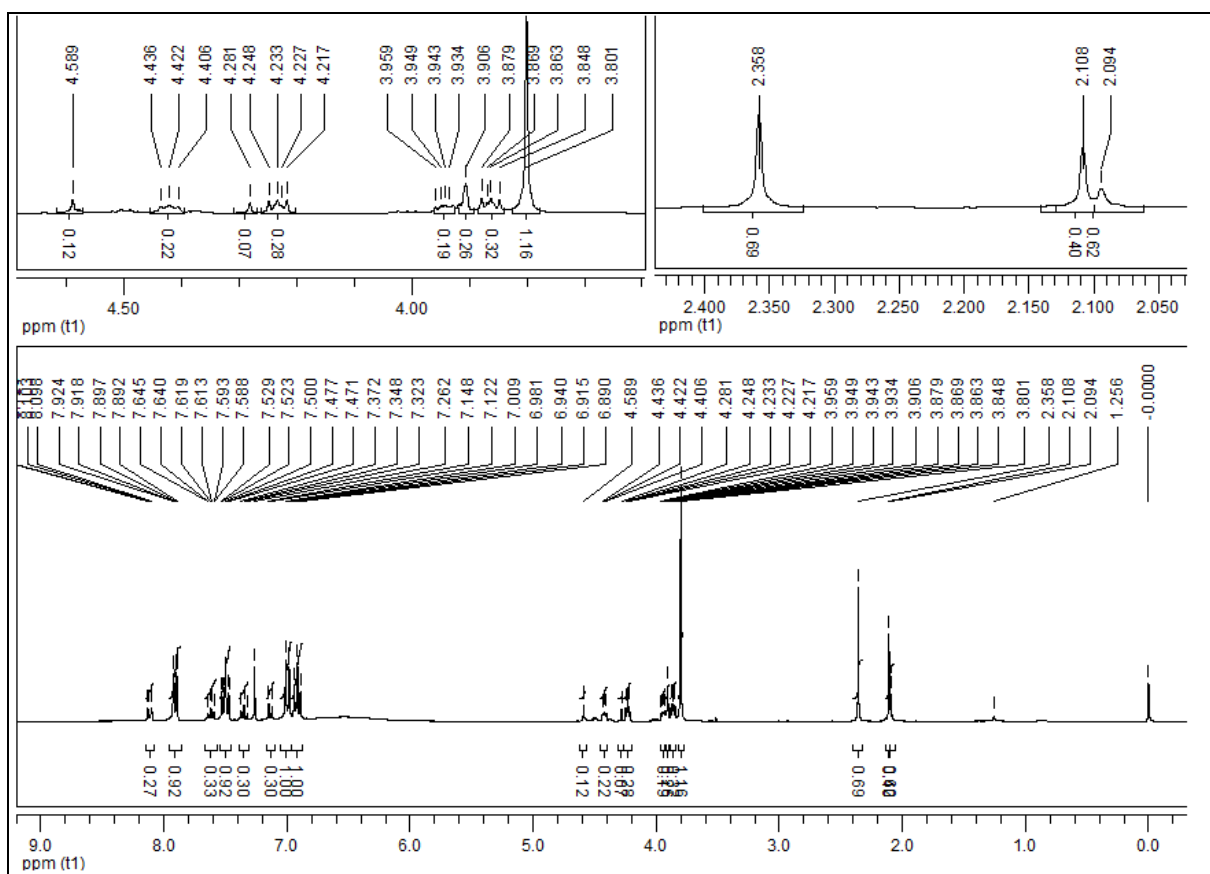
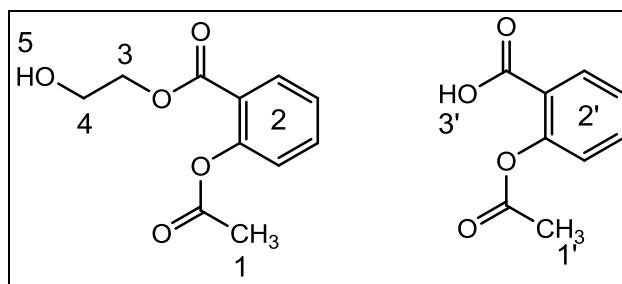
Após 24 horas de reação, as placas de cromatografia em camada delgada mostraram a formação de duas manchas de caráter mais apolar que o AAS ( $R_f$  0,16) com valores de  $R_f$  de 0,28 e 0,41 em fase móvel clorofórmio/metanol 9:1 (v/v).

No RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 45a) é possível observar sinais de oito hidrogênios distintos na região entre 6,89 e 8,13 ppm, que podem estar relacionados ao hidrogênios do anel aromático do intermediário II e aos hidrogênios do anel aromático do AAS ( $\text{H}_2$  e  $\text{H}_2'$ ). O singlete em 2,35 ppm (Espectro 45b) pode estar relacionado aos hidrogênios do grupo acetila do AAS ( $\text{H}_1$ ). Ademais, nesse mesmo espectro, os sinais entre 3,94 e 3,95 ppm e entre 4,21 e 4,24 ppm sugerem a presença dos hidrogênios do etilenoglicol do intermediário II ( $\text{H}_3$  e  $\text{H}_4$ ), porém em baixa intensidade. Esses resultados indicam que possivelmente, a reação gerou mistura entre o produto desejado e o material de partida (AAS).

Como houve indicações da obtenção do intermediário II pelo método C1, decidiu-se pela purificação do produto, utilizando coluna cromatográfica em gradiente de concentração. O sistema solvente utilizado para a purificação foi clorofórmio/metanol nas proporções de 10:0; 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 4:6; 3:7 e 2:8 (v/v), respectivamente. Entretanto, o procedimento foi ineficiente na tentativa de isolar o intermediário II (dados não mostrados).



**Espectro 45a.** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da esterificação entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol utilizando cloreto de oxalila com destaque para a região entre 6 e 9 ppm (experimento C1). *Software:* MestreC 4.7.



**Espectro 45b.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da esterificação entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol utilizando cloreto de oxalila com destaque para a região entre 2 e 4,6 ppm (experimento C1). *Software:* MestreC 4.7.

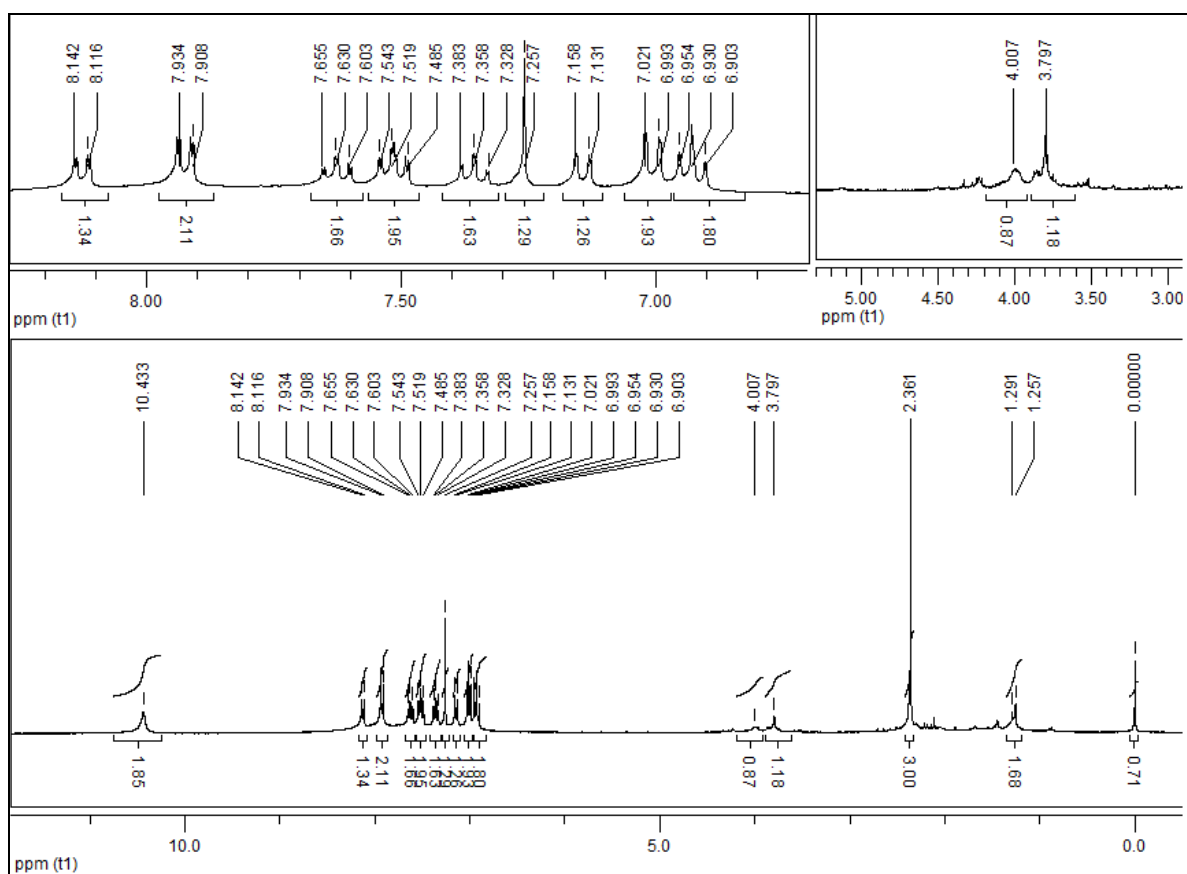
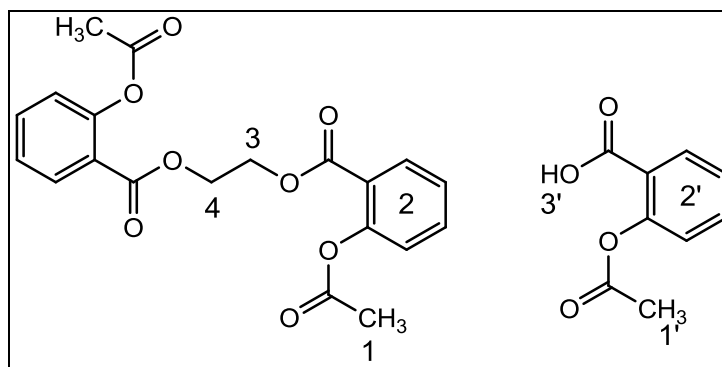
- Experimento C2: método utilizando cloreto de tionila (adaptado de JIANG, 2010)

Como o método C2 possivelmente foi eficiente na obtenção do intermediário II, as reações com cloretos de ácido podem representar boa alternativa para essa síntese. Dessa maneira, o experimento C2 consiste na utilização de outro cloreto de ácido como agente condensante: o cloreto de tionila. A proporção molar utilizada entre AAS e etilenoglicol foi de 1:20, respectivamente.

A placa de cromatografia em camada delgada na fase móvel clorofórmio/metanol 9:1 (v/v) mostrou a formação de um produto mais apolar com  $R_f$  de 0,5, em relação ao AAS ( $R_f$  0,16), o que sugere a obtenção do intermediário II.

O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 46) apresentou sinais referentes ao AAS livre em 2,36 ppm ( $\text{H}_1$ ), em 10,43 ppm ( $\text{H}_3$ ) e entre 6,90 e 8,14 ppm ( $\text{H}_2$ ). Nesta última região, é possível identificar sinais de oito hidrogênios distintos, sugerindo a obtenção de mistura entre o intermediário de interesse e o material de partida. Entretanto, o singlete em 3,79 ppm pode estar relacionado aos  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_4$  do etilenoglicol com duas substituições, o que não é desejado. Dessa maneira, os métodos com agentes clorantes não foram eficientes para a síntese do intermediário II ou apresentaram produto de difícil separação na coluna cromatográfica. Então, optou-se pela busca de outra rota sintética para a síntese do intermediário de interesse.





**Espectro 46.** RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da esterificação entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol utilizando cloreto de tionila (experimento C2). *Software:* MestreC 4.7.

- Método D: método utilizando EDC como agente condensante (adaptado de HORVATH, DEPRÉ, ORMEROD, 2008)

Para o método D utilizou-se o EDC como agente condensante e o DMAP como catalisador da reação. Como discutido anteriormente, alternativamente ao DCC, o EDC forma como produto secundário da reação o EDU, sendo este solúvel em água, o que facilita a sua remoção. Além disso, o EDC mostrou bons resultados para a síntese do intermediário IB, que também utiliza como material de partida o etilenoglicol, o que torna esse método promissor.

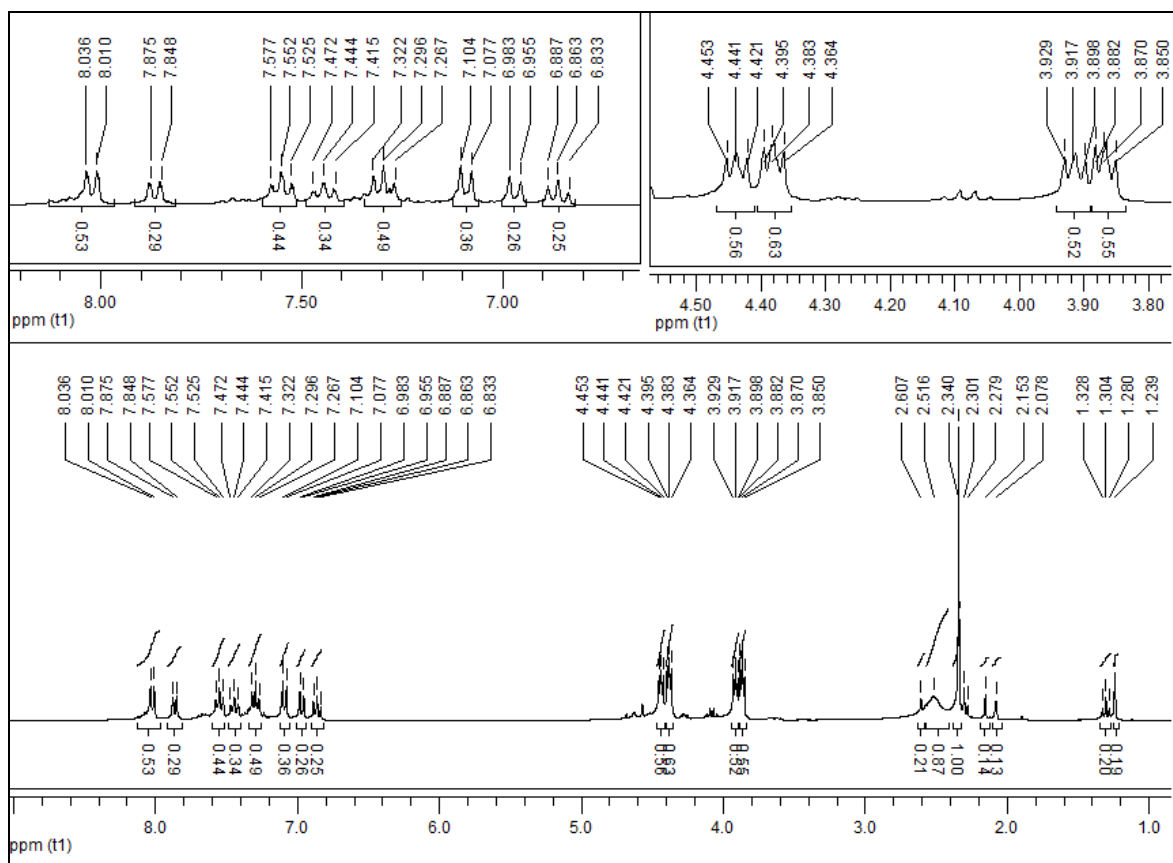
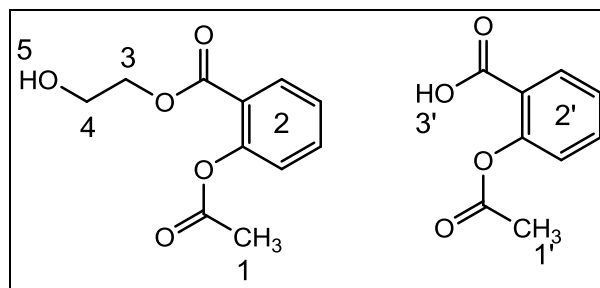
A proporção molar utilizada entre AAS e etilenoglicol foi de 1:1,05, de acordo com a referência descrita por Horvath e colaboradores (2008). Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada na fase móvel hexano/acetato de etila 1:1 (v/v) mostrou a formação de quatro manchas bastante próximas, mas diferentes do AAS ( $R_f$  de 0,40), o que sugere que houve reação. Os valores de  $R_f$  obtidos foram: 0,45; 0,60; 0,75; e 0,84.

O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 47) do produto impuro apresentou sinais que sugerem a obtenção do intermediário de interesse. Esses sinais podem ser observados em 2,43 ppm ( $\text{H}_1$ ), entre 3,85 e 4,45 ppm ( $\text{H}_3$  e  $\text{H}_4$ ) e entre 6,83 e 8,03 ppm ( $\text{H}_2$ ). Entretanto, nesta última região, existem sinais de oito hidrogênios distintos, o que pode representar a mistura de AAS (material de partida) e do intermediário II, assim como observado para o método C. O RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 48) apresentou sinais da obtenção do intermediário II em 66,73 e 60,84 ppm ( $\text{C}_6$  e  $\text{C}_5$ , respectivamente), relacionados aos carbonos do etilenoglicol, em 12,73 ppm, referente carbono metílico do AAS ( $\text{C}_1$ ), em 170,20 ppm, relacionado à carbonila do grupo acetila do fármaco ( $\text{C}_2$ ) e os sinais dos carbonos do anel aromático entre 112,26 e 136,02 ppm ( $\text{C}_3$ ). Assim como para o RMN de  $^1\text{H}$ , nesta última região existem sinais em excesso, que podem corresponder aos carbonos do anel aromático do AAS livre. Esses resultados sugerem a obtenção do intermediário II impuro.

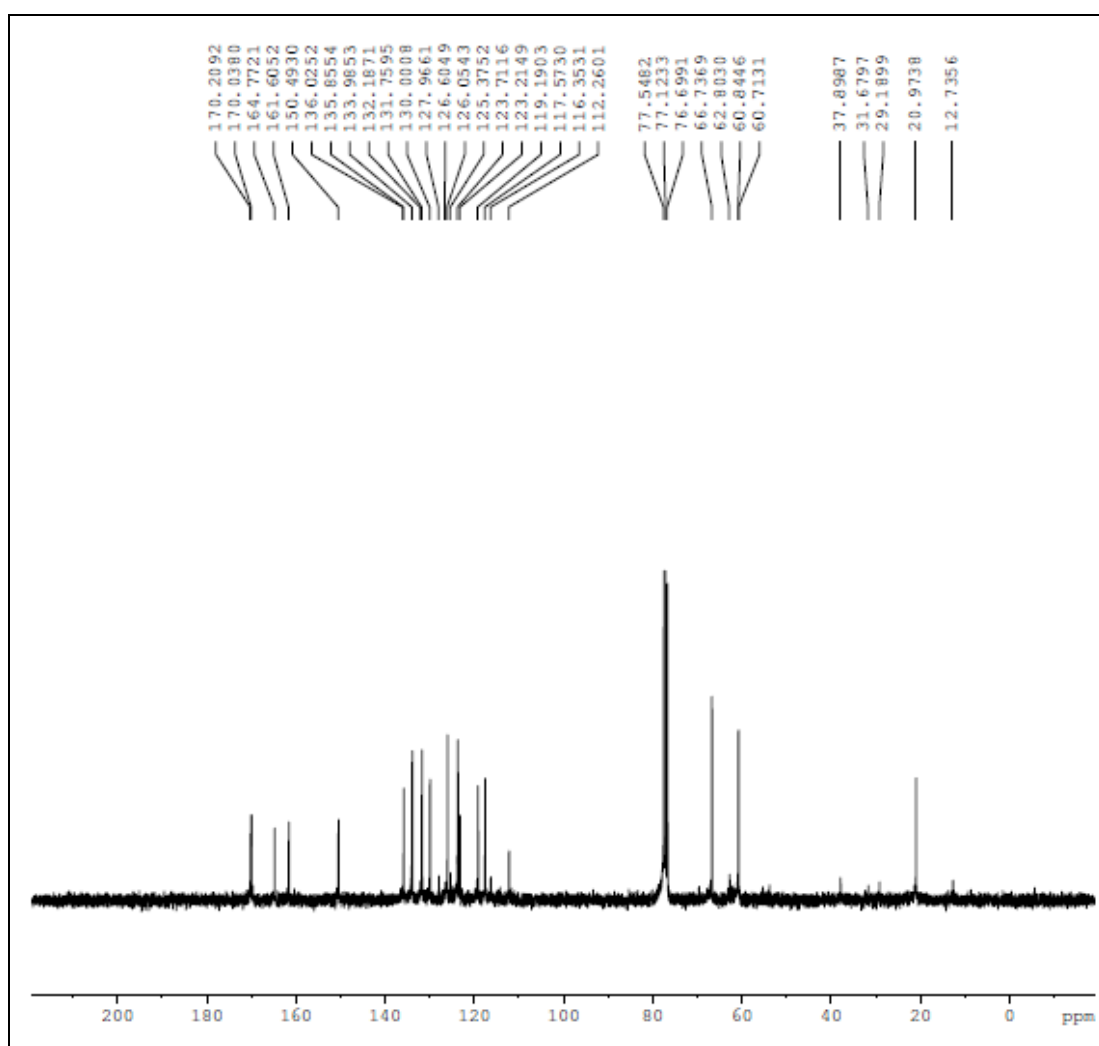
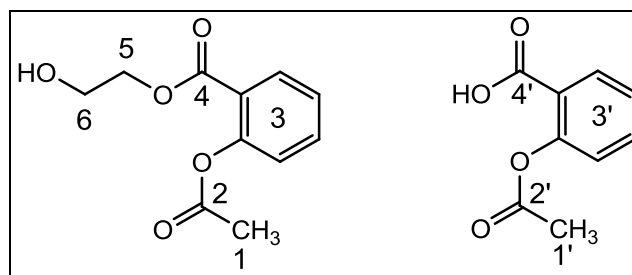
Como os resultados foram promissores, realizou-se uma coluna cromatográfica para purificar o produto obtido. A coluna foi realizada em gradiente de concentração utilizando as proporções de 10:0; 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 4:6; 3:7; 2:8; 1:9 de hexano/acetato de etila, respectivamente. Após o

processo de purificação, somente a fração correspondente ao  $R_f$  de 0,45 foi isolada.

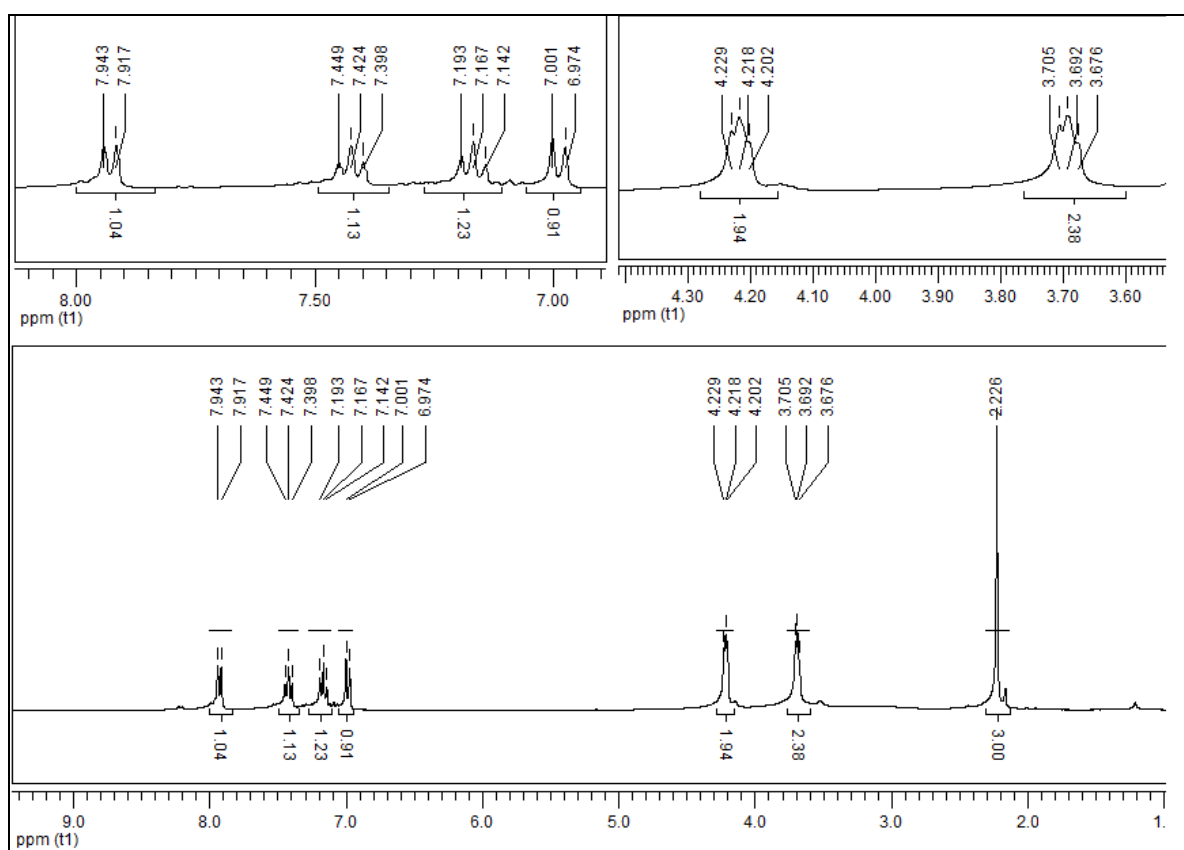
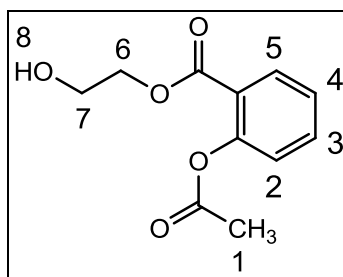
O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 49) dessa fração mostrou que a síntese do intermediário II por esse método foi bem sucedida. Os sinais em 7,9 ( $\text{H}_5$ ), 7,4 ( $\text{H}_4$ ), 7,2 ( $\text{H}_3$ ), 6,7 ( $\text{H}_2$ ) e 2,22 ppm ( $\text{H}_1$ ) correspondem aos hidrogênios do anel do AAS. Em adição, os sinais em 3,7 e 4,2 ppm são relativos aos hidrogênios do etilenoglicol ( $\text{H}_5$  e  $\text{H}_6$ , respectivamente). O RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 50) confirma a obtenção desse produto pelos sinais em 20,8 ppm ( $\text{C}_1$ ), 60,2 ppm ( $\text{C}_{11}$ ), 66,7 ppm ( $\text{C}_{10}$ ), 123,1 ppm ( $\text{C}_8$ ); 123,7 ( $\text{C}_4$ ); 126,1 ( $\text{C}_6$ ); 131,7 ( $\text{C}_7$ ); 133,9 ( $\text{C}_5$ ), 150,4 ( $\text{C}_3$ ); 164,7 ( $\text{C}_9$ ) e 170,1 ( $\text{C}_2$ ). Dessa maneira, o método com EDC mostrou ser o melhor método para a síntese do intermediário II. O produto obtido apresentou-se como um óleo de cor castanha e com rendimento médio de 31%.



**Espectro 47.** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da esterificação entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol utilizando EDC (Método D). *Software:* MestreC 4.7.



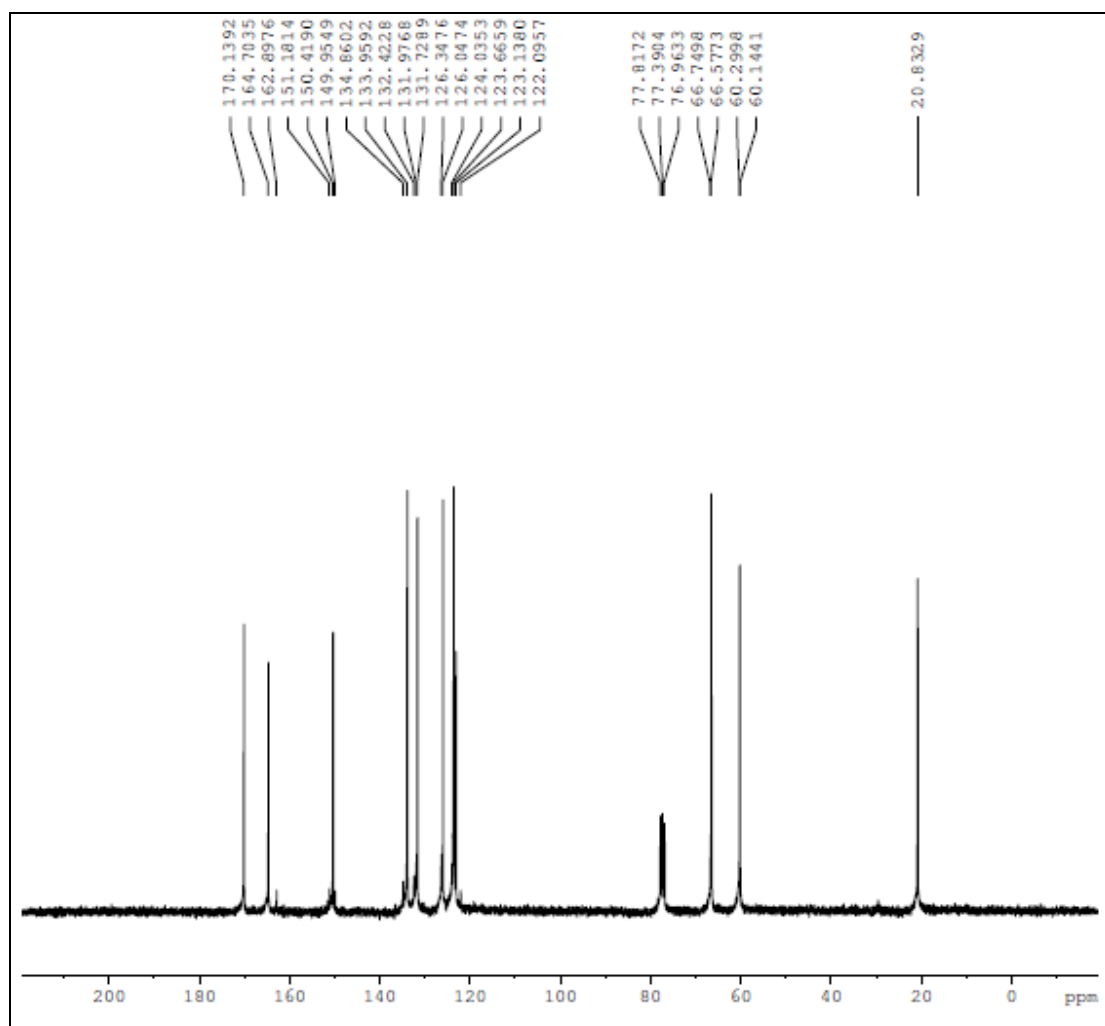
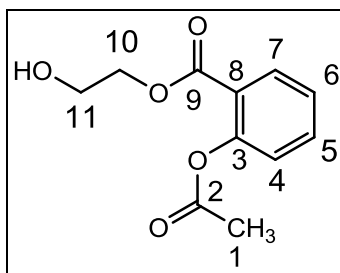
**Espectro 48.** RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da esterificação entre ácido acetilsalicílico e etilenoglicol utilizando EDC (Método D).



**Espectro 49.** RMN  $^1\text{H}$  do intermediário II utilizando EDC (Método D). Software: MestreC 4.7.

**RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), 300 MHz,  $\delta = \text{ppm}$**

2,22 (s, 3H,  $\text{H}_1$ ); 3,7 (t, 2H,  $\text{H}_6$ ,  $J=4,4$  Hz); 4,2 (t, 2H,  $\text{H}_7$ ,  $J=4,1$  Hz); 7,9 (d, 1H,  $\text{H}_5$ ,  $J=7,8$  Hz); 7,4 (t, 1H,  $\text{H}_3$ ,  $J=7,7$  Hz); 7,2 (t, 1H,  $\text{H}_4$ ,  $J=7,7$  Hz); 6,7 (d, 1H,  $\text{H}_2$ ,  $J=8,1$  Hz)



**Espectro 50.** RMN  $^{13}\text{C}$  do intermediário II utilizando EDC (Método D). Software: MestreC 4.7.

**RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), 75 MHz,  $\delta = \text{ppm}$**

77,4 ( $\text{CDCl}_3$ ); 20,8 ( $\text{C}_1$ ); 60,2 ( $\text{C}_{11}$ ); 66,7 ( $\text{C}_{10}$ ); 123,1 ( $\text{C}_8$ ); 123,7 ( $\text{C}_4$ ); 126,1 ( $\text{C}_6$ );  
131,7 ( $\text{C}_7$ ); 133,9 ( $\text{C}_5$ ); 150,4 ( $\text{C}_3$ ); 164,7 ( $\text{C}_9$ ); 170,1 ( $\text{C}_2$ )

#### 4.1.2.5 Síntese da rosuvastatina protegida (COREY, VENKATESWARLU, 1972)

Considerando a disponibilidade de grupos funcionais livres na molécula de rosuvastatina e a possibilidade de reações cruzadas que esses grupos poderiam ocasionar durante o procedimento de esterificação com o intermediário II, optou-se por proteger as hidroxilas livres desse fármaco. Esta proteção teve o objetivo de conferir seletividade de reação para a próxima etapa de esterificação e, conseqüentemente, obter de um composto com menos impurezas.

O grupo protetor escolhido para esse procedimento foi o *tert*-butildimetilsilano (TBDMS). De acordo com Greene e Wuts (1999), esse grupo protetor é um dos mais populares na síntese orgânica, por ser estável em grande variedade de processos sintéticos e, principalmente, ser facilmente removido sob condições que não interferem em outros grupos funcionais, o que o torna interessante para a síntese do dendrímero proposto.

Após 12 horas de reação, a cromatografia em camada delgada mostrou a formação de duas manchas mais apolares em relação à rosuvastatina ( $R_f$  0,33), com valores de  $R_f$  de 0,66 e 0,9, que indicam a formação do produto desejado com uma e duas hidroxilas protegidas, respectivamente.

Como o objetivo desse experimento foi obter o produto com as duas hidroxilas protegidas, optou-se por purificar o composto obtido utilizando o cromatógrafo automático Isolera Prime, com fase móvel clorofórmio/metanol em gradiente de concentração. Esse procedimento foi realizado com sucesso e a fração de interesse com  $R_f$  de 0,9 foi isolada.

O RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 51) do produto apresentou sinais referentes à rosuvastatina com as duas hidroxilas protegidas. Esses sinais podem ser observados em 0,76 e 0,78 ppm, correspondentes hidrogênios  $\text{H}_{13}$  e em 0 ppm, correspondentes aos hidrogênios  $\text{H}_{14}$  do grupo protetor. Como as hidroxilas protegidas estão ligadas aos carbonos quirais do fármaco, os sinais correspondentes aos hidrogênios metílicos  $\text{H}_{14}$  podem apresentar-se como quatro singletos distintos. Entretanto, é possível observar no espectro a presença de seis singletos nessa região. Acredita-se que os dois singletos adicionais possam estar relacionados ao excesso de reagente utilizado na reação, que ao entrar em contato com a água utilizada no procedimento de



extração, formou um derivado hidroxilado (TBDMSOH). Em adição, o singlete em 0,81 ppm também parece estar relacionado ao grupo protetor hidroxilado. Os demais sinais presentes no espectro são correspondentes da rosuvastatina e estão localizados entre: 7,47 e 7,51 ppm (H<sub>1</sub>); 6,95 e 7,01 ppm (H<sub>2</sub>); 6,35 e 6,43 ppm (H<sub>3</sub>); 5,34 e 5,42 ppm (H<sub>4</sub>); 4,13 e 4,18 ppm (H<sub>5</sub>); 4,00 e 4,05 ppm (H<sub>6</sub>); 3,46 ppm (H<sub>12</sub>); 3,41 ppm (H<sub>11</sub>); 3,22 e 3,30 ppm (H<sub>9</sub>); 2,34 e 2,53 ppm (H<sub>8</sub>); 1,44 e 1,65 ppm (H<sub>7</sub>) e 1,16 e 1,92 ppm (H<sub>10</sub>). Esses sinais em adição aos sinais do grupo protetor discutidos anteriormente confirmam a obtenção do intermediário desejado. Entretanto, este apresenta o TBDMSOH como impureza.



## 4.2 MODELAGEM MOLECULAR

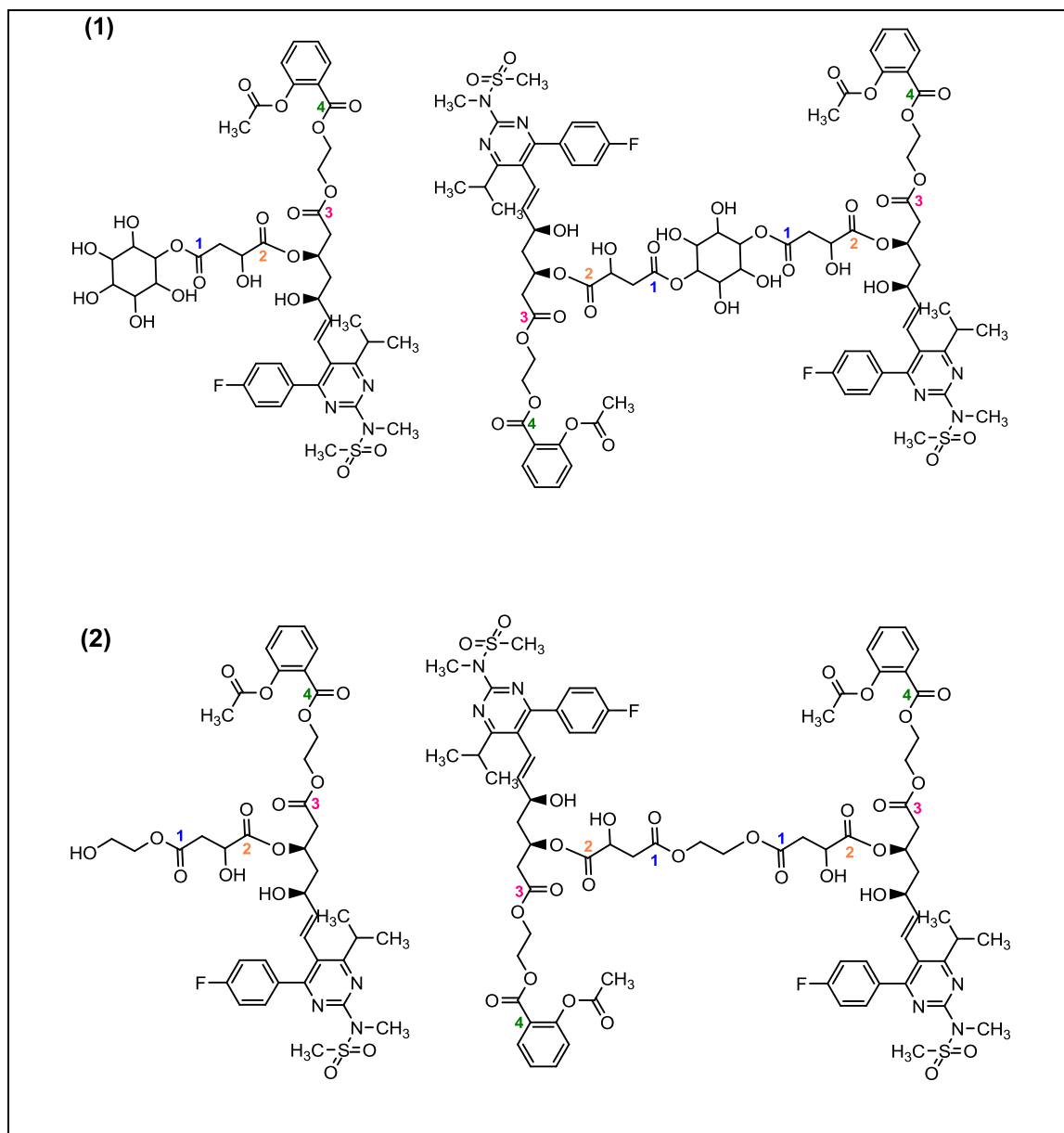
### 4.2.1 Estudo *in silico* de liberação do pró-fármaco dendrimérico de primeira geração (GIAROLLA et al., 2010)

O estudo *in silico* de liberação dos pró-fármacos dendriméricos foi aplicado seguindo trabalho anterior realizado por Giarolla e colaboradores (2010). O objetivo desse trabalho foi avaliar o comportamento dos dendrímeros propostos frente à atividade enzimática, ou seja, avaliar, de modo preliminar, como seria a clivagem dessas estruturas em sistema biológico contendo enzimas hidrolíticas, no caso, esterases inespecíficas. Para o desenvolvimento desse estudo, planejaram-se dendrímeros de uma e duas ramificações com foco central de *mio*-inositol ou etilenoglicol, ácido L(-)-málico e etilenoglicol como espaçantes, rosuvastatina e ácido acetilsalicílico como compostos bioativos.

Ao término do protocolo computacional, os dendrímeros foram avaliados pelas carbonilas das ligações do tipo éster presentes na estrutura. Esse processo consistiu em avaliar dois aspectos importantes: a disponibilidade espacial e a densidade eletrônica das carbonilas. Outro aspecto abordado foi o número de ligações de hidrogênio intramoleculares que podem contribuir para a estabilidade dos modelos.

A disponibilidade espacial foi analisada com o objetivo de prever o acesso enzimático aos grupos carbonílicos. É importante ressaltar que a liberação desses dendrímeros depende, primordialmente, do acesso das enzimas às ligações lábeis presentes na estrutura, de modo que o impedimento estérico representa fator limitante neste processo. Em adição, o potencial eletrostático dos grupos carbonílicos foi avaliado por meio de mapas de potencial eletrostático (MPE). Os MPE refletem a suscetibilidade da carbonila à clivagem enzimática, sendo que as carbonilas com menor densidade eletrônica (eletrofílicas) são consideradas as mais favoráveis ao ataque nucleofílico enzimático. Para essas duas análises, as carbonilas das ligações do tipo éster foram divididas e nomeadas como: C1, carbonila próxima ao foco central; C2, carbonila próxima à rosuvastatina; C3, carbonila próxima ao etilenoglicol e C4,

carbonila próxima ao ácido acetilsalicílico (Figura 44). Vale ressaltar que apesar do ácido acetilsalicílico possuir um grupo carbonila na sua estrutura, nesse estudo só foram consideradas as carbonilas utilizadas na montagem dos dendrímeros.



**Figura 44.** Representação esquemática do dendrímero planejado para o estudo com foco central de *myo*-inositol (1) ou etilenoglicol (2) e com uma e duas ramificações de rosuvastatina e ácido acetilsalicílico. Destaque para as carbonilas suscetíveis à clivagem.

Após as simulações de dinâmica molecular, obtiveram-se os confôrmeros de menor energia mínima para os modelos com uma e duas ramificações com os diferentes focos centrais. Esses confôrmeros foram avaliados quanto à sua integridade estrutural (*root means square derivation*,

RMSD), valor de energia total do sistema e número de ligações de hidrogênio presentes na estrutura. Os dados obtidos nessa avaliação encontram-se na Tabela II.

A integridade estrutural dos modelos foi avaliada a partir do valor de RMSD gerado pela superposição do confômero de menor energia mínima obtido por dinâmica molecular, com o modelo obtido na minimização de energia. Considerou-se que a integridade estrutural foi mantida quando o valor de RMSD apresentava-se menor que 1,5 Å, como instituído por Tokarski e Hopfinger (1997). Para os modelos estudados, foi possível observar a manutenção da integridade estrutural, pois os valores de RMSD permaneceram inferiores a 1,5 Å (Tabela 10).

A energia total do sistema ( $E_{total}$ ) foi calculada para determinar sua estabilidade. Essa energia corresponde à soma das contribuições energéticas para cada modelo. Algumas dessas contribuições são, por exemplo, a energia de estiramento, interação do tipo 1-4 (Lennard Jones), interação de van der Waals, energias de flexão e torção, além das interações eletrostáticas de ligação de hidrogênio e de solvatação. No geral, quanto mais negativo é o valor de  $E_{total}$ , mais energeticamente favorável é o sistema (TOKARSKI, HOPFINGER, 1997).

Em relação à estabilidade, pode-se notar que tanto para os modelos com etilenoglicol quanto para os modelos com *mio*-inositol como foco central, quanto maior o número de ramificações, mais negativo o valor de  $E_{total}$  e, portanto, mais energeticamente favorável o sistema. Entretanto, para os modelos com *mio*-inositol o número de ligações de hidrogênio não foi determinante para a redução de energia total do sistema, já que o modelo com uma ramificação apresentou maior número de ligações intramoleculares de hidrogênio (três ligações) e menor valor de  $E_{total}$  em relação ao modelo com duas ramificações. Este último apresentou menor número de ligações de hidrogênio (duas ligações) e maior valor de  $E_{total}$ . Portanto, a relação entre número de ligações de hidrogênio e estabilidade para esse modelo foi inversa.

Para os modelos com etilenoglicol como foco central, o comportamento observado foi contrário aos modelos com *mio*-inositol. O número de ligações de hidrogênio apresentou relação direta com a redução do valor de  $E_{total}$ . Nesse

caso, foi possível observar que quanto maior o número de ligações de hidrogênio, mais energeticamente favorável foi o sistema.

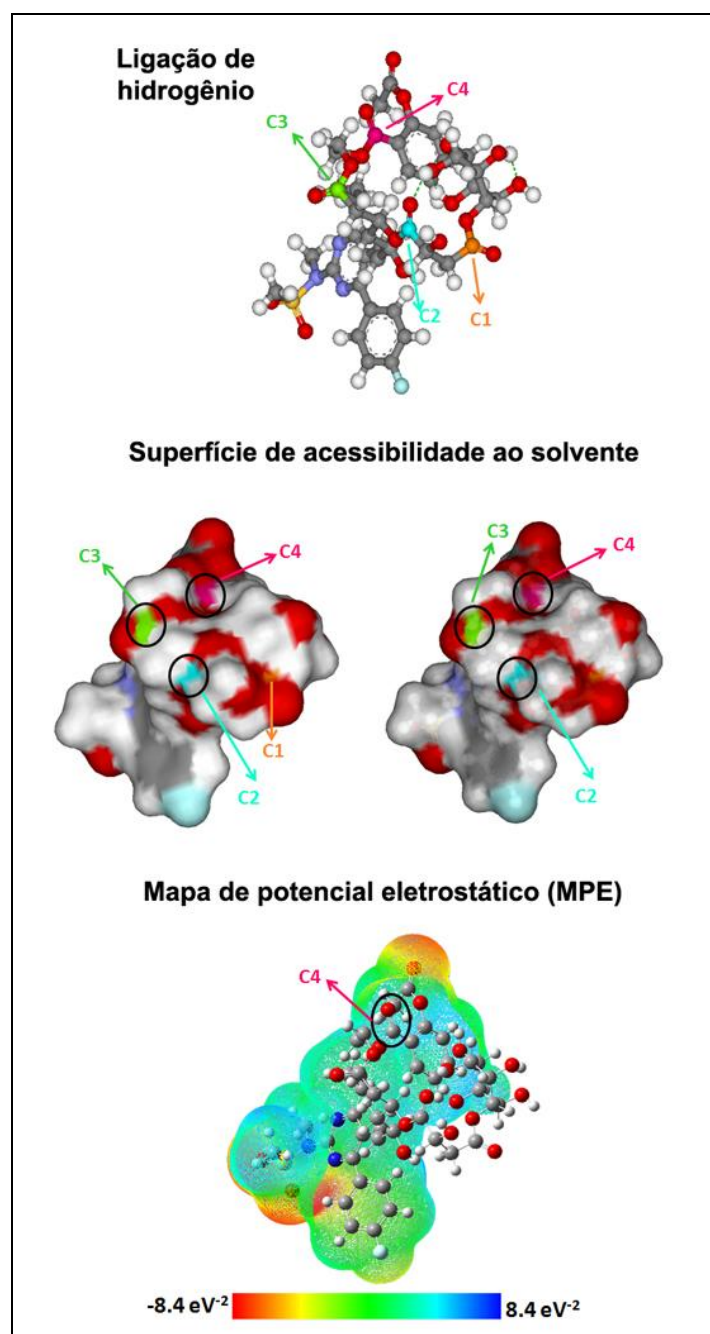
**Tabela 10.** Parâmetros obtidos para os dendrímeros propostos com diferentes focos centrais

Foco central	Número de ramificações	RMSD (Å)	E <sub>total</sub> (kcal/mol)	Número de ligações de hidrogênio
<i>mio</i> -inositol	1	0,119	-100,736	3
	2	0,236	-126,956	2
etilenoglicol	1	8,58 x 10 <sup>-2</sup>	-50,3957	2
	2	0,110	-23,7142	0

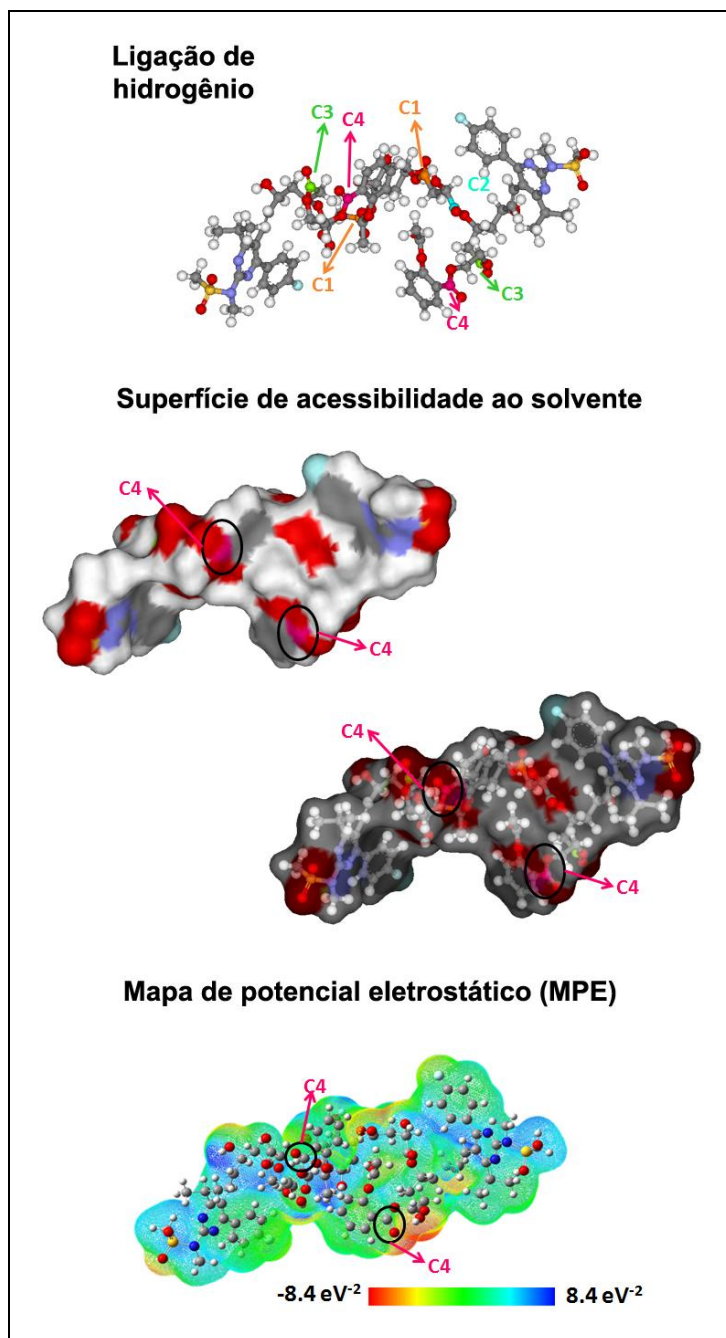
Como citado anteriormente, a informação sobre a previsão do ataque nucleofílico enzimático foi avaliada pela superfície de acessibilidade ao solvente e o mapa de potencial eletrostático. Para o modelo com uma ramificação e *mio*-inositol como foco central (Figura 36), as carbonilas C2 (próxima à rosuvastatina), C3 (próxima ao espaçante de etilenoglicol) e C4 (próxima ao ácido acetilsalicílico) apresentaram área de superfície de acessibilidade ao solvente semelhante. Entretanto, a ligação de hidrogênio intramolecular entre a C2 e o foco central pode prejudicar o ataque enzimático nessa região. Dessa maneira, o ponto de clivagem mais favorável parece ser a C4, pois este possui menor densidade eletrônica em relação a C3.

Os demais modelos com duas ramificações e foco central de *mio*-inositol (Figura 37), uma ramificação com foco central de etilenoglicol (Figura 38) e duas ramificações com foco central de etilenoglicol (Figura 39) apresentaram resultados semelhantes ao anterior. A carbonila C4, próxima ao ácido acetilsalicílico, mostrou ser a mais suscetível ao ataque enzimático, devido à maior superfície de acessibilidade ao solvente e a menor densidade eletrônica.

Dessa maneira, o estudo *in silico* de liberação dos dendrímeros mostrou-se ferramenta útil na determinação dos prováveis pontos de clivagem da estrutura dendrítica, entretanto, esses não substituem ensaios *in vivo* e *in vitro*, que devem ser realizados para validação dos dados obtidos.

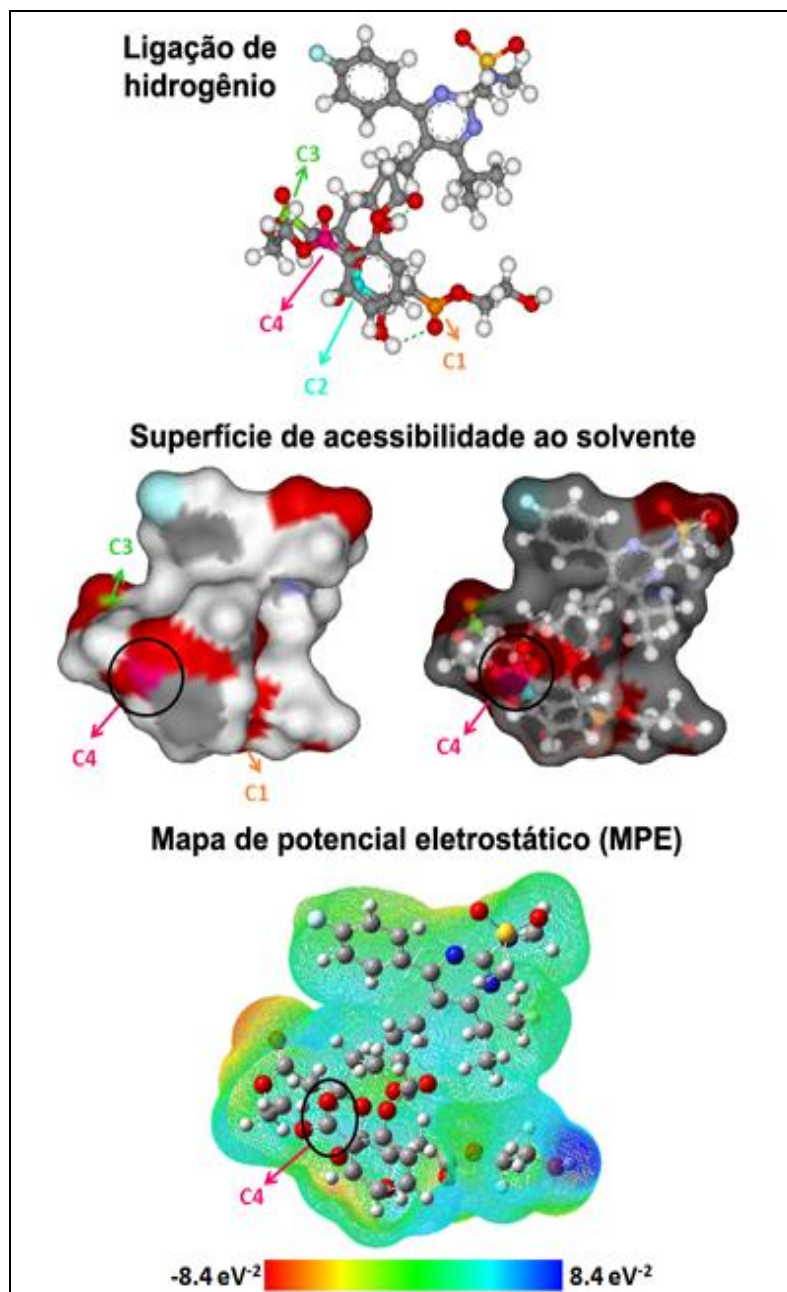


**Figura 45.** Modelo 3D do dendrímero de uma ramificação de rosuvastatina e ácido acetilsalicílico e foco central de *mio*-inositol. As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas verdes pontilhadas. O grupo carbonílico com maior superfície de acessibilidade ao solvente está destacado em rosa. A faixa de coloração do MPE foi de  $-8,4 \text{ eV}^{-2}$  (vermelho) a  $8,4 \text{ eV}^{-2}$  (azul). Os carbonos estão representados em cinza, hidrogênios em branco, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, flúor em azul claro e enxofre em amarelo.

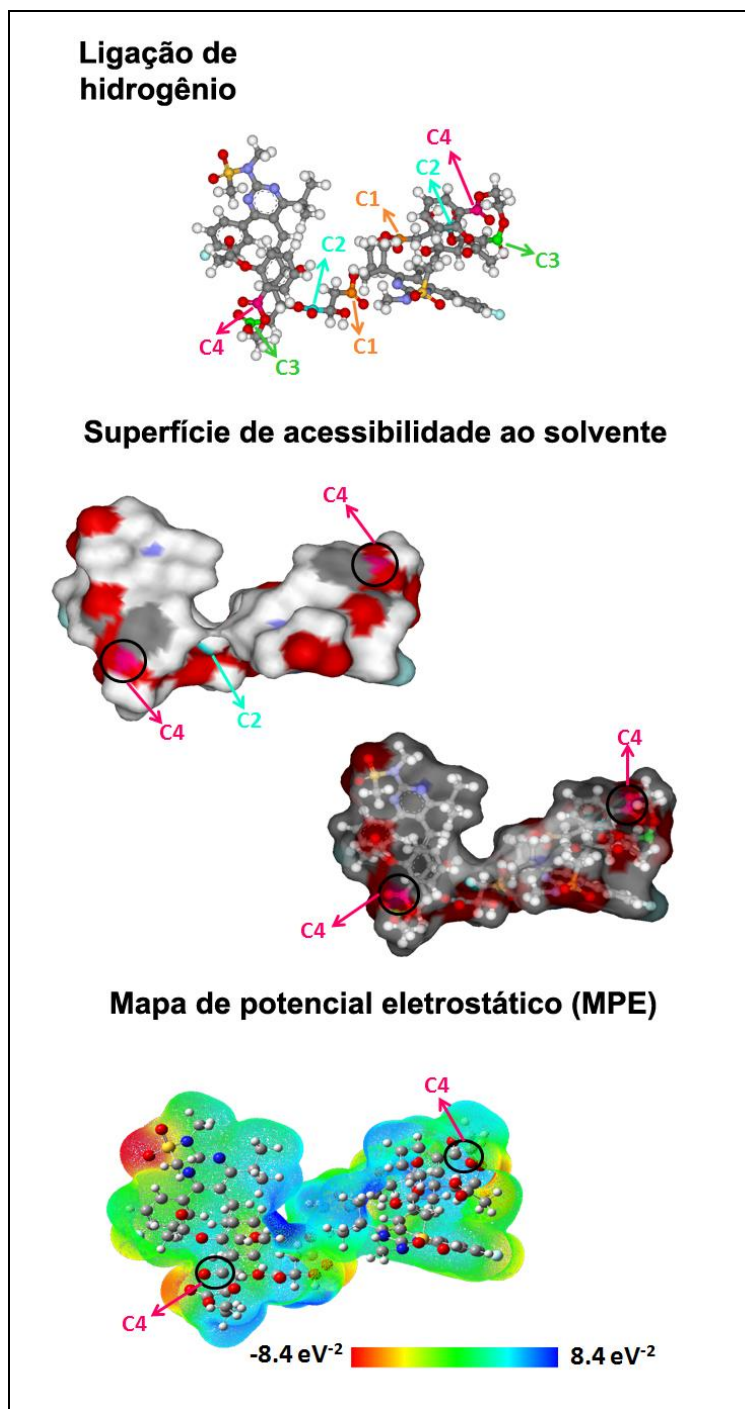


**Figura 46.** Modelo 3D do dendrímoro de duas ramificações de rosuvastatina e ácido acetilsalicílico e foco central de *mio*-inositol. As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas verdes pontilhadas. O grupo carbonílico com maior superfície de acessibilidade ao solvente está destacado em rosa. A faixa de coloração do MPE foi de -8,4 eV<sup>-2</sup> (vermelho) a 8,4 eV<sup>-2</sup> (azul). Os carbonos estão representados em cinza, hidrogênios em branco, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, flúor em azul claro e enxofre em amarelo.





**Figura 47.** Modelo 3D do dendrímero de uma ramificação de rosuvastatina e ácido acetilsalicílico e foco central de etilenoglicol. As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas verdes pontilhadas. O grupo carbonílico com maior superfície de acessibilidade ao solvente está destacado em rosa. A faixa de coloração do MPE foi de  $-8,4 \text{ eV}^{-2}$  (vermelho) a  $8,4 \text{ eV}^{-2}$  (azul). Os carbonos estão representados em cinza, hidrogênios em branco, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, flúor em azul claro e enxofre em amarelo.



**Figura 48.** Modelo 3D do dendrímero de duas ramificações de rosuvastatina e ácido acetilsalicílico e foco central de etilenoglicol. As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas verdes pontilhadas. O grupo carbonílico com maior superfície de acessibilidade ao solvente está destacado em rosa. A faixa de coloração do MPE foi de  $-8,4 \text{ eV}^{-2}$  (vermelho) a  $8,4 \text{ eV}^{-2}$  (azul). Os carbonos estão representados em cinza, hidrogênios em branco, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul, flúor em azul claro e enxofre em amarelo.

## *Conclusões*

*A teoria sempre acaba, mais cedo ou mais tarde,  
assassinada pela experiência.*

*Albert Einstein*

## 5 CONCLUSÕES PARCIAIS

### ➤ SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO IA

- Os métodos que utilizaram DCC como agente condensante foram os mais promissores e, possivelmente, levaram à obtenção do produto desejado. Entretanto, as reações apresentaram muitas impurezas, de difícil eliminação;
- Apesar da reação mais limpa, o método do anidrido misto com 4-nitrofenilcloroformato gerou um anidrido misto estável, que não sofreu ataque nucleofílico pelo álcool e, portanto, não levou à formação do intermediário de interesse;
- As reações com CDI, cloreto de tionila e EDC não foram eficientes na síntese do intermediário IA.

### ➤ SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO IB

- Os métodos do anidrido misto com cloroformato de etila e 4-nitrofenilcloroformato levaram à obtenção de um anidrido misto estável semelhante ao obtido na síntese do intermediário IA, e, portanto, não foram eficientes;
- Os experimentos que utilizaram EDC (experimento B2) e CDI como agentes condensantes geraram o intermediário de interesse com uma e duas ramificações. Estes foram purificados com sucesso por coluna cromatográfica.

### ➤ SÍNTESE DO MALATO DE ETILENOGLICOL

- As reações de desproteção do ácido málico protegido utilizando solução aquosa de ácido clorídrico 1 M, 0,5 M e 0,1 M levaram à hidrólise do éster da ligação entre espaçante e foco central. O mesmo foi observado para o método com ácido acético glacial:THF:água nas proporções de 4:1:2 (v/v/v);

- O método com ácido acético glacial:THF:água nas proporções de 1:1:1 (v/v/v) não hidrolisou a ligação éster entre o etilenoglicol e o espaçante, porém, não gerou o intermediário desprotegido.

#### ➤ SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO II

- Assim como para o intermediário IA, as reações que utilizaram DCC apresentaram espectros com excesso de impurezas e de difícil interpretação. Existem indícios da obtenção do intermediário II, entretanto, diante da dificuldade de remoção do DCU, decidiu-se utilizar outros métodos de síntese;
- Métodos do anidrido misto utilizando cloroformato de etila e 4-nitrofenilcloroformato, nas suas diferentes variações, não foram eficientes. Estes levaram à formação do anidrido misto estável entre o agente condensante e o AAS;
- O método com cloreto de oxalila não gerou o intermediário de interesse;
- Existem indícios da obtenção do intermediário II pelo método com cloreto de tionila, entretanto, o produto obtido foi de difícil purificação;
- O intermediário II foi obtido e purificado com sucesso utilizando o método com EDC.

#### ➤ PROTEÇÃO DAS HIDROXILAS DA ROSUVASTATINA

- A proteção das hidroxilas do fármaco foi realizada com sucesso. Entretanto, o espectro apresentou excesso de sinais referentes ao grupo protetor hidroxilado.

➤ **MODELAGEM MOLECULAR**

- A modelagem molecular auxiliou na avaliação preliminar do comportamento dos dendrímeros frente às esterases inespecíficas, apontando os prováveis pontos de clivagem.

# *Perspectivas*

*Existem coisas melhores adiante do que qualquer outra que  
deixamos para trás.*

*C.S. Lewis*

## 6 PERSPECTIVAS

- Explorar novas metodologias para a síntese do intermediário IA, bem como seus métodos de purificação;
- Dar continuidade à síntese e purificação do intermediário IB e do intermediário II utilizando EDC como agente condensante;
- Estudar novas condições reacionais para desproteção do malato de etilenoglicol;
- Sintetizar o intermediário III a partir da rosuvastatina protegida.



## *Referências*

*O livro é um mestre que fala, mas que não responde.*

*Platão*

## 7 REFERÊNCIAS

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

AHMED, H.M.; BLAHA, M.J.; NASIR, K. Effects of physical activity on cardiovascular disease. **The American Journal of Cardiology**, v.109, p.288-295, 2012.

ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. Major Outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic: the antihypertensive and lipid-Lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). **The Journal of the American Medical Association**, v.288, p.2981-2997, 2002.

ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; JONGH, D.C.; JOHSON, C.R.; LEBEL, N.A.; STEVENS, C.L. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1976. p.478-480.

AL-MASRI, A.T.; SAADEH, H.A.; MOSLEH, I. M.; MUBARAK, M. S. Synthesis of new compounds derived from metronidazole and amino acids and their esters as antiparasitic agents. **Medicinal Chemistry Research**, v.21, p.1700-1707, 2012.

- ANDERSON, G.W.; PAUL, R. N-N'-Carbonyldiimidazole, a new reagent for peptide synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v.80, p.4423, 1958.
- ANDRADE, C. H.; TROSSINI, G. H. G.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular no ensino de química farmacêutica. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.1, p.1-23, 2010.
- ARAB, G.; AVILÉ, J.; RIVIERA, M.; MARTÍNEZ, J.; PARTE-PÉRE, M.A.; SÁNCHEZ, N.; CONTRERAS, F.; COLAZZO, M. Efectos cardiovasculares de los inhibidores de la COX-2: um mito o una realidad. **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica**, v.22, p.30-34, 2003.
- ARAÚJO, L.F.; SOEIRO, A.M.; FERNANDES, J.D.L.; JÚNIOR, C.V.S. Eventos cardiovasculares: um efeito de classe dos inibidores de COX-2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.85, p.222-229, 2005.
- AZAMBUJA, M.I.R.; FOPPA, M.; MARANHÃO, M.F.C.; ACHUTTI, A.C. Impacto econômico dos casos de doença cardiovascular grave no Brasil: uma estimativa baseada em dados secundários. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.91, p.163-171, 2008.
- BABU, R. V.; MLLIKARJUN, V.; NIKHAT, S. R.; SRIKANTH, G. Dendrimers: a new carrier system for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences**, v.1, p.1-10, 2010.
- BAHIA, L.; AGUIAR, L.G.K.; VILLELA, N.R.; BOTTINO, D. BOUSKELLA, E. O endotélio na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v.50, p.291-303, 2006.

- BANERJEE, A. A review of family history of cardiovascular disease: risk factor and research tool. **The international Journal of Clinical Practice**, v.66, p.522-524, 2012.
- BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R. Modelagem molecular um ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v.20, p.1-11, 1997.
- BHATTACHARYA, P.; GEITNER, N.K.; SARUPIA, S.; KE, P.C. Exploiting the physicochemical properties of dendritic polymers for environmental and biological applications. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v.15, p.4461-4816, 2013.
- BOAS, U.; HEEGAARD, P.M.H. Dendrimers in drug research. **Chemical Society Reviews**, v.33, p.43-63, 2004.
- BODE, M.L.; GATES, J.P.; GEBRETNISAE, S.Y.; VLEGGAR, R. Structure elucidation and stereoselective total synthesis of pavettamine, the causal agente of gousiekte. **Tetrahedron**, v.66, p.2026-2036, 2010.
- BOGLIOLO, L. **Patologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1472p.
- BRASHERS, V.L. Alterations of cardiovascular function. In: HUETHER, S.E.; McCANCE, K.L. **Understanding Pathophysiology**. Missouri: Elsevier, 2008. cap. 23, p.606-666.
- BRAUTBAR, A.; BALLANTYNE, C.M. Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond. **Nature Reviews**, v.8, p.253-265, 2011.

- CALABRÒ, R.S.; GERVASI, G.; BRAMANTI, P.; CAVALLINI, A. Thrombolysis in Ischemic Stroke: Focus on new treatment strategies. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**, v.7, p.42-52, 2012.
- CALZA, L. Long-term use of rosuvastatin: a critical risk benefit appraisal and comparison with other antihyperlipidemics. **Drug, Healthcare and Patient Safety**, v.1, p.25–33, 2009.
- CAMINADE, A.M. Syntheses of dendrimers and dendrons. In: CAMINADE, A.M.; TURRIN, C.O.; LAURENT, R.; OUALI, A.; NICOT-DELAVALUX, B. Ed. **Dendrimers**: towards catalytic, material and biomedical uses. United Kingdom: Jhon Wiley & Sons, 2011. p.3-30.
- CAMPO, V.L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v.30, p.425-430, 2007.
- CARALLO, C.; FORTUNATO, L.; FRANCESCHI, M.S.; IRACE, C.; TRIPOLINO, C.; CRISTOFARO, M.G.; GIUDICE, M.; GNASSO, A. Periodontal disease and carotid atherosclerosis: are hemodynamic forces a link?. **Atherosclerosis**, v.213, p.263-267, 2010.
- CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, v.26, p.428-438, 2003.
- CARVALHO, A.C.A.D.; OLIVEIRA, L.S.D.A.F.; MELO, D.P.D.; CRUSOÉ-REBELLO, I.; CAMPOS, P.S.F. Desenvolvimento de placas de ateroma em pacientes diabéticos e hipertensos. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.9, p.73-77, 2010.

- CASELA FILHO, A.; ARAÚJO, R.G.D.; GALVÃO, T.G.; CHAGAS, A C.P.  
Inflamação e aterosclerose: integração de novas teorias e valorização dos novos marcadores. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v.11, p.14-19, 2003.
- CATERINA, R.D.; HUSTED, S.; WALLENTIN, L.; AGNELLI, G.; BACHMANN, F.; BAIGENT, S.; JESPERSEN, J.; KRISTENSEN, S. D.; MONTALESCOT, G.; SIEGBAHN, A.; VERHEUGT, F.W.A.; WEITZ, J.  
Anticoagulants in heart disease: current status and perspectives. **European Heart Journal**, v.28, p.880-913, 2007.
- CERVATO, A.M.; MAZZILLI, R.N.; MARTINS, I.S.; MARUCCI, M.F.N. Dieta habitual e fatores de risco para doenças cardiovasculares. **Revista de Saúde Pública**, v.31, p.227-235, 1997.
- CHANNON, M.K. The endothelium and the pathogenesis of atherosclerosis. **Medicine**, v.30, p.54-58, 2002.
- CHAPMAN, M.J. From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis: a role for the combination of statin and aspirin in secondary prevention. **Pharmacology & Therapeutics**, v.113, p.184-196, 2007.
- CHAPMAN, M.J.; REDFERN, J.S.; McGOVERN, M.E.; GIRAL, P. Niacin and fibrates in atherogenic dyslipidemia: Pharmacotherapy to reduce cardiovascular risk. **Pharmacology & Therapeutics**, v.126, p.314-345, 2010.

- CHAVES, D.S.A.; COSTA, S.S. Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. **Química Nova**, v.33, p.172-180, 2010.
- CHRISTIE, W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for Chromatographic analysis. **Advances in Lipid Methodology – Two**, p.69-111, 1993.
- CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. O processo de latenciação do planejamento de fármacos. **Química Nova**, v.22, p.75-84, 1999.
- CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GÜIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.155-179, 2005.
- COLPO, A. LDL Cholesterol: Bad Cholesterol or Bad Science. **Journal of American Physicians and Surgeons**, v.10, p.83-89, 2005.
- COREY, E. J. VENKATESWARLU, A. Protecting of hydroxyl groups as tert-Butyldimethylsilyl derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v.94, p.6190-6191, 1972.
- CÔRREA-CAMACHO, C.R.; DIAS-MELICIO, L.A.; SOARES, A.M.V.C. Aterosclerose, um resposta inflamatória. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v.14, p.41-48, 2007.
- COSMI, B.; GUALTIERO, P. Old and new heparins. **Thrombosis Research**, v.129, p.388-391, 2012.

- CROUCH, M.A.; GRAMLING, R. Family history of coronary heart disease: evidence-based applications. **Primary Care: Clinics in office practice**, v.32, p.995-1010, 2005.
- D'EMANULE, A.; ATTWOOD, D. Dendrimer-drug interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.2147-2162, 2005.
- DAMEN, E.W.; WIEGERINCK, P.H.; BRAAMER, L.; SPERLING, D.; De Vos D, SCHEEREN, H.W. Paclitaxel esters of malic acid as prodrugs with improved water solubility. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.8, p.427-432, 2000.
- DELONG, M.A.; McFADDEN, J.M.; ROYALTY, S.M.; TOONE, E.J.; YINGLING, J.D. Prodrug derivatives of acids using alcohols with homotopic hydroxy groups and methods for their preparation and use. US Pat. 0254920. 2007. 46p.
- DOHERTY, D. **MOLSIM**: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software - User's Guide, version 3.2, The Chem21 Group Inc.: Lake Forest, IL, 1997.
- DOKKEN, B.B. The pathophysiology of cardiovascular disease and diabetes: beyond blood pressure and lipids. **Diabetes Spectrum**, v.21, p.160-165, 2008.
- EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B. *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. **British Journal of Pharmacology**, v.152, p.9-20, 2007.
- ERHARDT, L. Cigarette smoking: An undertreated risk factor for cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v.205, p.23-32, 2009.



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

FALCÃO, F.J.D.A.; CARVALHO, L.; CHAN, M.; ALVES, C.M.R.; CARVALHO, A.C.C.; CAIXETA, A.M. Receptores plaquetário P2Y12: importância na intervenção coronária percutânea. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, DOI:10.5935/abc.20130162.

FARIAS JUNIOR, J.C.; MENDES, J.K.F.; BARBOSA, D.B.M.; LOPES, A.D.S. Fatores de risco cardiovascular em adolescentes: prevalência e associação com fatores sociodemográficos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.14, p.50-62, 2011.

FERRANINI, E.; IOZZO, P. Is insulin resistance atherogenic? A review of the evidence. **Atherosclerosis Supplements**, v.7, p.5-10, 2006.

FERRANTI, S.D.; RIFAI, N. C-reactive protein and cardiovascular disease: a review of risk prediction and interventions. **Clinica Chimica Acta**, v.317, p.1-15, 2002.

FERREIRA, C.N.; SOUSA, M.D.O.; DUSSE, L.M.S.; CARVALHO, M.G. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.31, p.416-421, 2010.

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

FIEGENBAUM, M.; HUTZ, M.H. Farmacogenética de fármacos hipolipemiantes.

**Medicina Ribeirão Preto**, v.39, p.543-553, 2006.

FONSECA, F.A.H. Farmacocinética das estatinas. **Arquivos Brasileiros de**

**Cardiologia**, v.85, p.09-14, 2005.

FORD, E.S. C-reactive protein concentrations and cardiovascular disease risk

factors in children: findings from the national health and nutrition

examination survey 1999-2000. **Circulation**, v.108, p-1053-1058, 2003.

FOROUHI, N.G.; SATTAR, N. CVD risk factors and ethnicity – A homogeneous

relationship?. **Atherosclerosis Supplements**, v.7, p.11-19, 2006.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Lipoproteínas de alta densidade: aspectos

metabólicos, clínicos, epidemiológicos e de intervenção terapêutica.

Atualização para os clínicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**,

v.87, p.672-679, 2006.

FRANCO, M.; COOPER, R.S.; BILAL, U.; FUSTER, V. Challenges and

opportunities for cardiovascular disease prevention. **The American**

**Journal of Medicine**, v.124, p.95-102, 2011.

FRANÇOSO, L.A.; COATES, V. Evidências anatomopatológicas do início da

aterosclerose na infância e adolescência. **Arquivos Brasileiros de**

**Cardiologia**, v.78, p.131-136, 2002.

FROHLICH, J.; AL-SARRAF, A. Cardiovascular risk and atherosclerosis

prevention. **Cardiovascular Pathology**, v.22, p.16-18, 2013.

FURST, D.E.; ULRICH, R.W. Fármacos antiinflamatórios não esteroides, fármacos anti-reumáticos modificadores da doença, analgésicos não-opioides e fármacos usados no tratamento da gota. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2007. cap.36, p.515-538.

GABRIEL, A. S.; TRISTÃO, C. K.; IZAR, L. C.; DOMINGUES, C.; GABRIEL, E. A.; CLIQUET, M. G. Avaliação da agregação plaquetária e dosagem do fibrinogênio em pacientes com doenças cardiovasculares e sua correlação com o uso de aspirina e fatores de risco coronariano. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v.21, p.289-294, 2006.

GARCÍA, R.G.G.; LÓPEZ-JARAMILLO, P. Uso de aspirina em la prevención de enfermedades cardiovasculares. **Revista Colombiana de Cardiologia**, v.15, p.223-229, 2008.

**Gaussian 03W for Windows**, version 6; Gaussian Inc.: Pittsburgh, PA, 1995-2003.

GIAROLLA, J. **Pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofurais potencialmente antichagásicos**: estudo de condições sintéticas para a primeira geração. São Paulo, 2007. 155p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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

GIAROLLA, J. **Síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente antichagásicos e leishmanicidas derivados de hidroximetilnitrofural, 3-hidroxi-flavona e quercetina.** São Paulo, 2012. 409p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

GOLDBERG, D.S.; GHANDEHARI, H.; SWAAN, P.W. Cellular entry of G3.5 Poly (amido amine) dendrimers by clathrin-and dynamin-dependent endocytosis promotes tight junctional opening in intestinal epithelia. **Pharmaceutical Research**, v.27, p.1547-1557, 2010.

GOMES, F.; TELO, D.F.; SOUZA, H.P.; NICOLAU, J.C.; HALPERN, A.; SERRANO Jr, C. V. Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, p.273-279, 2010.

GOMES, M.E.W.; FABRIS, C.; FILHO, J.L.B.; DREHER, R.; ROSITO, G.A. Antagonistas do receptor plaquetário GPIIb/IIIa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, p.255-264, 2000.

GONZALO, T.Y.M.; MUÑOZ-FERNANDEZ, A. **Dendrímeros y sus aplicaciones biomédicas.** Disponível em: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/992/1026>  
Acesso em: 16/06/2012 às 12h. 2009.

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

- GREECH, E.D.; RAMSDALE, D.R. Acute coronary syndrome: unstable angina and non-ST segment elevation myocardial infarction. **British Medical Journal**, v.326, p.1259-1261, 2003.
- GREEN, D.L.C.; KIDDLE, J.J.; THOMPSON, C.M. Stereochemistry of remote dianion addition to imines. Application to the synthesis of (1S, 8aS)-1-hydroxyindolizidine. **Tetrahedron**, v.51, p.2865-2874, 1995.
- GREENE, T.W.; WUTS, P.G.M. Protective groups in organic synthesis. 3ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.776p.
- HADARI, M.; ALI, M.; GANGEHEI, L.; CHEN, M.; ZHANG, W.; CYBULSKY, M. Increased oxidative stress in atherosclerosis-predisposed regions of the mouse aorta. **Life Sciences**, v.87, p.100-110, 2010.
- HALFORD, B. Dendrimers branch out. **Chemical & Engineering News**, v.83, p.30-36, 2005.
- HAMERSCHLAK, N.; ROSENFELD, L.G.M. Utilização de heparina e anticoagulantes orais na prevenção e tratamento da trombose venosa e embolia pulmonar. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.67, p.209-213, 1996.
- HAN, K.Y.; AMIDON, G.L. Targeted prodrug design to optimize drug delivery. **AAPS Pharmsci**, v.2, p.1-11, 2000.
- HAN, S.P.; KIM, Y.A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. **Tetrahedron**, v.60, p.2447-2467, 2004.

HARROLD, M. Antihyperlipoproteinemics and inhibitors of cholesterol biosynthesis. In: LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D. A. (Eds.) **Foye's principles of medicinal chemistry**. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2008. cap.30, p.797-819.

HEHRE, J.W.; SHUSTERMAN, A.J. **Molecular modeling in undergraduate chemistry education**. Disponível em: <http://www.wavefun.com/support/MMUndEd.pdf>. Acesso em: 18/06/12 às 9h. 2000.

HEINONEN, S. **Modeling cardiovascular complications of diabetes mellitus**: development of a new mouse model and evaluation of a gene therapy approach. Kuopio, 2010. Dissertação de Mestrado – Faculty of Health Sciences, University of Eastern Finland.

HENNEKENS, C.H.; SACKS, F.M.; TONKIN, A.; JUKEMA, W.; BYINGTON, R.P.; PITT, B.; BERRY, D.A.; BERRY, S.M., FORD, N.F.; WALKER, A. J., NATARAJAN, K.; SHENG-LIN, C.; FIEDOREK, F.T.; BELDER, R. Additive benefits of pravastatin and aspirin to decrease risks of cardiovascular disease. **Archives of Internal Medicine**, v.164, p.40-44, 2004.

HORVATH, A.; DEPRÉ, D.P.M.; ORMEROD, D.J. Processes and intermediates for preparing a macrocyclic protease inhibitor of HCV. WO Pat. 092955. 2011. 51p.

HOSAGANDI, B.D.; DAVE, R.H.; An efficient general method for esterification of aromatic carboxylic acids. **Tetrahedron Letters**, v.37, p.6375-6378, 1996.

- HOU, R.; GOLDBERG, A.C. Lowering low-density lipoprotein cholesterol: statins, ezetimibe, bile acid sequestrants, and combinations: comparative efficacy and safety. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v.38, p.79-97, 2009.
- HUCK, O.; SAADI-THIERS, K.; TENENBAUM, H.; DAVIDEAU, J.L.; ROMAGNA, C.; LAURENT, Y.; COTTIN, Y.; ROUL, J.G. Evaluating periodontal risk for patients at risk of or suffering from atherosclerosis: Recent biological hypotheses and therapeutic consequences. **Archives of cardiovascular disease**, v.104, p.352-358, 2011.
- HUSSAIN, M.A.; LIEBERT, T.; HEINZE, T. Acylation of cellulose with N, N'-carbonyldiimidazole-activated acids in the novel solvent dimethyl sulfoxide/tetrabutylammonium fluoride. **Macromolecular Rapid Communications**, v.25, p.916-920, 2004.
- HYPERCHEM PROGRAM RELEASE 7 for Windows, Hypercube, Inc.: Gainesville, FL, 2002.
- INOUE, K. Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers. **Progress in Polymer Science**, v.25, p.453-571, 2000.
- INSULL Jr, W. Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. **Southern Medical Journal**, v.99, p.257-273, 2006.
- INSULL Jr, W. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. **The American Journal of Medicine**, v.122, p.3-14, 2009.

ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. **Science**, v.292, p.1160-1164, 2001.

JESUS, A.M.R. **Dendrímeros e suas aplicações**. Disponível em: <http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos2003%20PDF/Alexandre%20Jesus.pdf>. Acesso em: 13/06/2009 às 17h. 2003.

JIANG, S.; DING, N.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; GENG, M.; LI, Y. Novel conjugates of aspirin with phenolic acid as anti-inflammatory agents having significantly reduced gastrointestinal toxicity. **Archiv der Pharmazie**, v.343, p.215-221, 2010.

JOULLIÉ, M.M.; LASSEN, K.M.; Evolution of amide bond formation. **Arkivoc**, v.2010, p.189-250, 2010.

KAPERONIS, E.A.; LIAPIS, C.D.; KAKISIS, J.D.; DIMITROULIS, D.; PAPAVALASSILOU. Inflammation and Atherosclerosis. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v.31, p.386-393, 2006.

KATRITZKY, A.R.; CAI, C.; COLLINS, M.D.; SCRIVEN, E.F.V.; SINGH, S.K.; BARNHARDT, E.K. Incorporation of microwave synthesis into the undergraduate organic laboratory. **Journal of Chemical Education**, v.83, p.634-636, 2006.

KING, C.S.; HOLLEY, A.B.; MOORES, L.K. Moving toward a more ideal anticoagulant: the oral direct thrombin and factor Xa inhibitors. **Recent Advances in Chest Medicine**, v.143, p.1106-1116, 2013.



- KINOSHITA, T.; SEKIGUCHI, Y.; FUKADA, H.; NAKANIWA, T.; TADA, T.; NAKAMURA, S.; KITaura, K.; OHNO, H.; SUZUKI, Y.; HIRASAWA, A.; NAKANISHI, I.; TSUJIMOTO, G. A detailed thermodynamic profile of cyclopentyl and isopropyl derivatives binding to CK2 kinase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.356, p.97-105, 2011.
- KLAJNERT, B.; BRYSEWSKA, M. Dendrimers: properties and applications. **Acta Biochimica Polonica**, v.48, p.199-208, 2001.
- LAHOZ, C.; MOSTAZ, J.M. Atherosclerosis as a systemic disease. **Revista Española Cardiología**, v.60, p.184-195, 2007.
- LEE, C.C.; MacKAY, J.A.; FRECHÉT, J.M.J.; SZOKA, F.C. Designing dendrimers for biological applications. **Nature Biotechnology**, v.23, p.1517-1526, 2005.
- LIBBY, P.; RIDKER, M.P.; HANSSON, K.G. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. **Journal of the American College of Cardiology**. v.54, p.2129-2138, 2009.
- LIN, Q.; JIANG, G.; TONG, K. Dendrimers in drug-delivery applications. **Designed Monomers and Polymers**, v.13, p.301-324, 2010.
- LINARELLI, M.C.B.; POTT Jr., H. Estatinas: uma revisão sobre aspectos vasculares. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.17, p.43-52, 2008.
- LIU, M.; FRÉCHET, J.M.J. Designing dendrimers for drug delivery. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v.2, p.393-401, 1999.

- LU, M.C.; LEMKE, T.L. Antithrombotics, thromobolytics, coagulants, and plasma extenders. In: LEMKE, T.L.; WILLIANS, D.A.(Eds.) **Foye's principles of medicinal chemistry**. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2008. cap.31, p.820-854.
- LUVAI, A.; MBAGAYA, W.; HALL, A.S.; BARTH, J.H. Rosuvastatin: a review of the pharmacology and clinical effectiveness in cardiovascular disease. **Clinical Medicine Insights: Cardiology**, v.6, p.17-33, 2012.
- MAAS, R.; BÖGER, R.H. Old and new cardiovascular risk factos: from unresolved issues to new opportunities. **Atherosclerosis Supplements**, v.4, p.5-17, 2003.
- MALLOY, M.J.; KANE, J.P. Fármacos usados na hiperlipidemia. In: KATZUNG, B.G. (Ed.) **Farmacologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2007. cap.35, p.503-514.
- MANSUR, A.P.; FAVARATO, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.99, p.755-761, 2012.
- MANTELL, S.J. Amino acid derivatives. US Pat. 057767. 2007. 36p.
- MARDER, O.; ALBERICIO, F. Industril application of coupling reagents in peptides. **ChemInform**, v.35, p.6-11, 2004.
- MARINOU, K.; TOUSOULIS, D. ANTONOPOULOS, A.S.; STEFANADI, E.; STEFANADIS, S. Obesity and cardiovascular disease: From pathophysiology to risk stratification. **International Journal of Cardiology**, v.138, p.3-8, 2010.

- McCARTHY, T.D.; KARELLAS, P.; HENDERSON, S.A.; GIANNIS, M.; O'KEFFE, D.F.; HEERY, G.; PAULL, J.R.A.; MATTHEWS, B.R.; HOLAN, G. Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI Prevention. **Molecular Pharmaceutics**, v.2, p.312-318, 2005.
- MEDINA, S.H.; EL-SAYED, M.E.H. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents. **Chemical Reviews**, v.109, p.3141-3157, 2009.
- MINEMOTO, Y.; KOMETANI, T.; PIAO, J.; ADACHI, S. Oxidation of oleoyl residue of its esters with ethyleneglycol, glycerol and erythritol. **LWT – Food Science and Technology**, v.39, p.1-5, 2006.
- MONTALBETTI, C.A.G.N.; FALQUE, V. Amide Bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v.61, p.10827-10852, 2005.
- MONTEIRO, E.C.A.; TRINDADE, J.M.D.F.; DUARTE, A.L.B.P. CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios são esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v.9, p.53-63, 2008.
- MOOREFIELD, C.N.; SUJITH, P.; NEWKOME, G.R. Dendrimer Chemistry: supramolecular perspectives and applications. In: CHENG, Y. (Ed.) **Dendrimers-based drug delivery systems**. United New Jersey: Jhon Wiley & Sons, 2012. p.1-54.
- 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.

- NANJWADE, B.K.; BECHRA, H.M.; DERKAR, G.K.; MANVI, F.V.; NANJWADE, V.K. Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.38, p.185-196, 2009.
- NEISES, B.; STEGLICH, W. Esterification of carboxylic acids with dicyclohexylcarbodiimide/4-dimethylaminopyridine: tert-butyl ethyl fumarate. **Organic Syntheses**, v.63, p.183, 1985.
- NELSON, D.L., COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 978p.
- O'DONNELL, C.J.; ELOSUA, R. Cardiovascular risk factors. Insights from Framingham Heart Study. **Revista Española de Cardiología**, v.61, p.299-310, 2008.
- OLIVEIRA, D.C.; SILVA, R.F.; SILVA, D.J.; LIMA, V.C. Resistência à aspirina: realidade ou ficção?. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.95, p.e91-e94, 2010.
- OUT, C.; GROEN, A.K.; BRUFAU, G. Bile acid sequestrants: more than simple resins. **Current Opinion in Lipidology**, v.55, p.23-43, 2012.
- PALOMO, I.F.G.; TORRES, C.I.U.; MOORE-CARRASCO, R.E.; ALARCÓN, M.A.L.; MARAGAÑO, P.J.L. Antiagregantes plaquetarios: mecanismos de acción y riesgos asociados al uso. **Vitae**, v.16, p.133-143, 2009.
- PARASKEVAS, K.I.; BAKER, D.M.; VRENTZOS, G.E.; MIKHAILIDIS, D.P. The role of fibrinogen and fibrinolysis in peripheral arterial disease. **Thrombosis Research**, v. 122, p.1-12, 2008.

PATRICK, G.L. Computers in medicinal chemistry. In: \_\_\_\_\_, **An introduction to medicinal chemistry**. 5 ed. New York: Oxford, 2013. p.337-379.

PENALVA, R.A.; HUYOA, M.O.; CORREIA, L.C. L; FEITOSA, G.S.; LADEIA, A. M.T. Perfil lipídico e intensidade de doença aterosclerótica na síndrome coronariana aguda. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.90, p.24-30, 2008.

PINEDE, L.; DUHAUT, P.; NINET, J. Management of oral anticoagulants in the treatment of venous thromboembolism. **European Journal of Internal Medicine**, v.12, p.75-85, 2001.

POREZ, G.; PRAWITT, J.; GROSS, B.; STAELS, B. Bile acid receptor and targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease. **Journal of Lipid Research**, v.53, p.1723-1735, 2012.

PRASAD, D.S.; KABIR, Z.; DASH, A.K.; DAS, B.C. Cardiovascular risk factors in developing countries: A review of clinico-epidemiological evidence. **Cardiovascular Disease Prevention and Control**, v.5, p.115-123, 2010.

PRASAD, K.V.S.R.G.; BHARANTHI, K.; HASEENA. B.B. Applications of peptide coupling reagents – an update. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v.8, p.108-119, 2011.

PRUITT, R.N.; CHAGOT, B.; COVER, M.; CHAZIN, W.J.; SPILLER, B.; LACY, D.B. Structure-function analysis of inositol hexakisphosphate-induced autoprocessing Clostridium difficile toxin A. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, p.21934-21940, 2009.

PSARROS, C.; LEE, R.; MARGARITIS, M.; ANTONIADES, C. Nanomedicine for the prevention, treatment and imaging of atherosclerosis. **Maturitas**, v.73, p.52-60, 2012.

RABELO, L.M. Fatores de risco para doença aterosclerótica na adolescência. **Jornal de Pediatria**, v.77, p.153-164, 2001.

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

RIBEIRO, R.A.; MELLO, R.G.B.; MELCHIOR, R.; DILL, J.C.; HOHMANN, C.B.; LUCCHESI, A.M.; STEIN, R. RIBEIRO, J.P. POLANCZYK, C.A. Custo anual do manejo da cardiopatia isquêmica crônica no Brasil. Perspectiva pública e privada. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.85, p.3-8, 2005.

RIZZO, M.; RINI, G. B.; SPINA, A. G.; BERNEIS, K. The effects of ezetimibe on LDL-cholesterol: Quantitative or qualitative changes? **Atherosclerosis**, v.204, p.330-333, 2009.

ROMÁN, O.A.; BADILLA, M.S.; DUSSAUBAT, A.M.A. La hipertensión arterial, ¿Sólo un biomarcador de la enfermedad aterosclerótica sistémica?. **Revista Médica de Chile**, v.138, p.346-351, 2010.

ROSITO, G.A.; SILVA, O.B.D; FUCHS, F.D. Antitrombóticos na prevenção e no tratamento de acidentes vasculares encefálicos isquêmicos. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.4, p.366-371, 2000.

ROZMAN, D.; MONOSTORY, K. Perspectives of the non-statin hypolipidemic agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v.127, p.19-40, 2010.

- SANT'ANNA, C.M.R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (Recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, p.505-512, 2002.
- SANT'ANNA, C.M.R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: Uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v.1, p.49-57, 2009.
- SANTOS, H.F. O conceito da modelagem molecular. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v.4, p.1-2, 2001.
- SANTOS, G.M.; PEGORARO, M.; SANDRINI, F.; MACUCO, E.C. Fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose na infância e adolescência. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.90, p.301-308, 2008.
- SANTOS, J.L.D. **Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos a fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme**. Araraquara, 2009. 129p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- SANTOS, M.G; PEGORARO, M.; SANDRINI, F.; MACUCO, E.C. Fatores de risco no desenvolvimento da aterosclerose na infância e adolescência. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.90, p.301-308, 2008.
- SANTOS, S.D.S. **Leishmanicidas potenciais: estudo da síntese de fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração com hidroximetilnitrofuril**. São Paulo, 2012. 200p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

- SANTOS, W.B.; MESQUITA, E.V.; VIERIA, R.M.R; OLEJ, B.; COUTINHO, M.; AVEZUM, A. Proteína C-reativa e doença cardiovascular. As bases da evidência científica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.80, p.452-456, 2003.
- SBC (Sociedade Brasileira de Cardiologia). III Diretrizes sobre o tratamento do infarto agudo do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.83, p.1-86, 2004.
- SBC (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA). IV Diretrizes brasileiras sobre dislipidemia e prevenção da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.88, p.1-19, 2007.
- SCHENCK-GUSTAFSSON, K. Risk factors for cardiovascular disease in women. **Maturitas**, v.63, p.186-190, 2009.
- SHEEHAN, J.C.; HESS, P.G. A new method of forming peptide bonds. **Journal of the American Chemical Society**, v.77, p.1067-1068, 1955.
- SHO-JEN, C.; HUEI-KUNG, Y.; YU-CHI, C.; CHUN-YEN, C.; WEI-CHUNG, L.; PO-YI, Y. Physical activity and risk of cardiovascular disease among older adults. **International Journal of Gerontology**. DOI: 10.1016/j.ijge.2013.03.001.
- SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; CHUNG, M.C.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.C.; FERREIRA, E.I. Advances in prodrug design. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.5, p.893-914, 2005.



- SILVA, M.V.F.; DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.D.G. Antiagregantes plaquetários na prevenção primária e secundária de eventos aterotrombóticos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, p.78-84, 2013.
- SINGER, A.U; SKARINA, T.; ONOPRIYENKO, O.; EDWARDS, A.M.; ANDERSON, W.F.; SAYCHENKO, A. Structure of IDP00107, a potential N-acetyl-gamma-glutamylphosphate reductase from *Shigella flexneri*. DOI: 10.2210/pdb/pdb3dr3/pdb.
- SINGH, N.; JABEEN, T.; SHARMA, S.; BHUSHAN, A.; SINGH, T.P. Crystal structure of a complex formed between group II phospholipase A2 and aspirin at 1.86 Å resolution. DOI: 10.2210/pdb/pdb1tgm/pdb.
- STACH, K.; ZADDACH, F.; NGUYEN, X.D.; ELMAS, E.; KRALEV, S.; WEIB, C.; BORGGREFE, M.; KÄLSCH, T. Effects of nicotinic acid on endothelial cells and platelets. **Cardiovascular Pathology**, v. 21, p.89-95, 2012.
- STEINER, G. Fibrates and coronary risk reduction. **Atherosclerosis**, v.182, p.199-207, 2005.
- SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, v.71, p.445-462, v.71, 2009.
- SVENSON, S.; TOMALIA, D. A. Dendrimers in biomedical applications – reflections on the field. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.2106-2129, 2005.

- SZYMANSKI, P.; MARKOWICZ, M.; MIKICIUK-OLASIK, E. Nanotechnology in pharmaceutical and biomedical applications. Dendrimers. **Nano Brief Reports and Reviews**, v.6, p.509-539, 2011.
- TAN, Y. Y.; GAST, G.C.M.; Van der SCHOUW, Y.T.; Gender differences in risk factors for coronary heart disease. **Maturitas**, v.65, p.149-160, 2010.
- TELES, J.S; FUKUDA, E.Y.; FEDER, D. Varfarina: perfil farmacológico e interações medicamentosas com antidepressivos. **Einstein**, v.10, p.110-115, 2012.
- TERRA-FILHO, M.; MENNA-BARRETO, S.S. Recomendações para o manejo da tromboembolia pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.36(supl.1), p.S1-S68, 2010.
- TOBERT, J.A. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. **Nature Reviews**, v.2, p.517-526, 2003.
- TOKARSKI, J.S.; A. J. HOPFINGER, A.J. Constructing protein models for ligandreceptor binding thermodynamic simulations: An application to a set of peptidomimetic rennin inhibitors. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v.37, p.779-791, 1997.
- TOMALIA, D.A.; BAKER, H.; DEWALD, J.; HALL, M.; KALLOS, G.; MARTIN, S.; ROECK, J.; RYDER, J.; SMITH, P. A new class of polymers: starburst dendritic macromolecules. **Polymer Journal**, v.17, p.117-132, 1985.
- TORASKAR, M.P.; PANDE, V.G.; KADAM, V.J. Dendrimer: a new approach in pharmacy. **International Journal of Research In Pharmacy and Chemistry**, v.1, p.1100-1107, 2011.

- TOTH, P.P., Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it. **International Journal of Clinical Practice**, v.62, p.1246-1254, 2008.
- TSOMPANIDI, E.M.; BRINKMEIER, M.S. FOTIADOU, E.H.; GIAKOUMI, S.M.; KYPREOS, K. E. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.208, p.3-9, 2010.
- TUKULULA, M. **The design and synthesis of novel HIV-1 protease inhibitors**. Grahamstown, 2009. 148p. Master Thesis - Rhodes University.
- TWIBANIRE, J.D.A.K.; GRINDLEY, T.B. Polyester dendrimers. **Polymers**, v.4, p.794-879, 2012.
- VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling agents. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p.606-631, 2009.
- Van DIJK, R.A.; VIRMANI, J.H.; Von Der THÜSEN, A.F. SHAAPHERDER, J.H.N. The natural history of aortic atherosclerosis: A systematic histopathological evaluation of the peri-renal region. **Atherosclerosis**, v.210, p.100-106, 2010.
- VARGAS, F. **Síntese e aplicação de  $\beta$ -calcogeno amidas quirais em alquilações alílicas assimétricas**. Santa Maria, 2007. 188p. Tese de Doutorado – Faculdade de Química - Universidade Federal de Santa Maria.
- VERRI, J.; FUSTER, V. Mecanismos das síndromes isquêmicas agudas e da progressão da aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.68, p.461-467, 1997

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, p.326-337, 2006.

ViewerLite 4.2, Accelrys Inc., 2001.

VILES-GONZALEZ, J.F.; FUSTER, V., BADIMON, J.J. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. **European Heart Journal**, v.25, p.1197-1207, 2004.

VOET, D., VOET, J.G. **Fundamentos de bioquímica**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 1596p.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: \_\_\_\_\_. (Ed) **The practice of medicinal chemistry**. San Diego: Elsevier, 2008. p.721-742.

WHO (WORLD AND HEALTH ORGANIZATION). **Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control**, 2011. 164pa.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2011. Disponível em: <  
[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/resources/atlas/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/)>.

Acesso em: 18/06/2012 às 18hb

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2013. Disponível em:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>. Acesso em: 30/07/2013 às 12h.

WIERZBICKI, S.A.; POSTON, R.; FERRO, A. The lipid and non-lipid effects of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v.99, p.95-122, 2003.

YOKOYAMA, S. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1529, p. 231-244, 2000.

YOUSUF, O.; BHATT, D.L. The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. **Nature Reviews**, v.8, p.547-559, 2011.

ZALESIN, K.C.; FRANKLIN, B.A.; MILLER, W.M.; PETERSON, E.D.; McCULLOUGH, P.A. Impact of obesity on cardiovascular disease. **Medical Clinics of North American**, v.95, p.919-937, 2011.

ZEHNDER, J.L. Fármacos usados no distúrbio da coagulação. In: KATZUNG, B. G.(Ed.) **Farmacologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2007. cap.34, p.487-503.

*Anexos*