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

Leishmanicidas potenciais: estudo da síntese de fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração com hidroximetilnitrofural

Soraya da Silva Santos

Dissertação para obtenção do grau de
Mestre

Orientadora:
Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2012

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

Santos, Soraya da Silva
S237l Leishmanicidas potenciais : estudo da síntese de fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração com hidroximetilnitrofural / Soraya da Silva Santos. -- São Paulo, 2012.
200p.

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

1. Latenciação : Química farmacêutica 2. Quimioterápicos : Química farmacêutica 3. Fármaco : Planejamento : Química farmaceutica 4. Polímeros : Química farmacêutica I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

615.19 CDD

Soraya da Silva Santos

Leishmanicidas potenciais: estudo da síntese de fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração com hidroximetilnitrofural

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
orientadora/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICO ESTE TRABALHO

A Deus, pela proteção e por guiar o meu caminho em todos os momentos.

Agradeço por permitir a conclusão desta etapa tão importante para mim, por tudo que conquistei até agora, e peço sabedoria e que ilumine minha vida para eu possa conquistar muito mais.

À minha família:

Aos meus amados pais, Alencastro Oliveira Santos e Maria Aparecida da Silva Santos, pelos exemplos e todos os ensinamentos ao longo da minha vida, por todo o apoio, dedicação, força e por sempre aceitarem as minhas escolhas. Sem palavras para descrever tudo o que vocês representam para mim e a quem devo tudo que sou hoje!!!..Esta conquista, também, é de vocês.

À minha querida irmã, Vanessa da Silva Santos, minha melhor amiga, por toda amizade, incentivo, cumplicidade e com quem sempre pude contar em todos os instantes.

Às minhas meninas, "minha trupe", Bolinha, Lavínia e Vivi, minhas cachorrinhas, que enchem minha casa de alegria com suas peripécias e que me acompanham nos momentos de estudo.

Ao meu noivo, Leanderson Renato Poli, "meu eterno namorado", por todo amor, paciência e compreensão nos momentos de ausência, companheirismo e apoio dedicados durante todos esses anos.

Muito obrigada por vocês existirem e alegrarem a minha vida!

Todas as vitórias ocultam uma abdicação.

Simone de Beauvoir

À minha orientadora, Professora Titular Elizabeth Igne Ferreira, grande idealizadora deste projeto. Um grande exemplo de conduta pessoal e profissional, que foi e é muito mais que orientadora. Agradeço a oportunidade, por acreditar em mim e me ensinar o caminho da ciência. Muito obrigada pela realização deste sonho, por todo o apoio, amizade e ensinamentos científicos e pessoais ao longo destes anos.

Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é que alguém acredite nele.

Roberto Shinyashiki

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao meu assessor da FAPESP, por todas as sugestões que enriqueceram este estudo.

À Dra. Jeanine Giarolla, colaboradora direta neste trabalho, "clã dos dendrímeros", por todos os ensinamentos científicos e éticos, também, grande responsável por esta conquista. Muito obrigada por toda a parceria e amizade que transcedem ao laboratório.

À Dra. Kerly Pasqualoto, pela amizade, parceria e todas as sugestões e discussões nos estudos de modelagem molecular.

Às Professoras Dras. Carlota de Oliveira Rangel Yagui e Daniela Gonçales Rando, pelos ensinamentos e valiosas contribuições no exame de qualificação. Vocês contribuíram muito com esta pesquisa.

Aos professores Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini e Dr. Roberto Parise filho, pela convivência, amizade, colaboração e momentos de descontração.

Aos Drs. Fabrício Vargas, Marco Aurélio Graça Arribas e Márcio Henrique Zaim, por todas as discussões sintéticas, auxílio e conhecimento, importantes para o trabalho e para minha formação sintética.

Às minhas amigas e companheiras, Vanessa Almeida Otelo e Andressa Polidoro, por toda amizade, incentivo, apoio e parceria que extravasa o laboratório e por inúmeras vezes me acolherem na casa de vocês com muito carinho. Muito obrigada pelas discussões científicas e cotidianas.

*Aos colegas de laboratório, Bárbara Vaz, Charles de Lima Brito, Drielli Vital, Fredson Silva, Hamilton Bigatão, João Paulo Lemes (**in memorian**), Kátia Botelho, Kely Turra, Marina Primi, Natanael Segretti, Patrícia Sotelo, Ricardo Garcia, Ricardo Serafim e Tacila Pereira, pela ótima convivência, amizade e troca de experiências.*

Aos colegas de Universidade, Camila Tanabe, Elys, Juliana Pachioni, Marcela Silva, Mariana Damião, Maurício Tavares e Matheus Sá, que também, participaram desta trajetória.

À Maria Inês de Almeida Gonçalves, por todo o suporte técnico nas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêutica, Bete, David, Kelma e Jorge, sempre prestativos e atenciosos.

A todos da minha família e amigos que, de uma forma ou de outra, torceram por mim e colaboraram na realização desta vitória.

A todos vocês, o meu Muito obrigada!!!..

O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.

Elleanor Roosevelt

SANTOS, S.S. **Leishmanicidas potenciais: estudo da síntese de fármacos dirigidos dendriméricos de primeia geração com hidroximetilnitrofural.** 2012. 200p. Dissertação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2012.

RESUMO

A leishmaniose é considerada uma doença tropical extremamente negligenciada, que afeta regiões de extrema pobreza. Trata-se de doença emergente com alta morbidade e mortalidade. Aproximadamente 20 diferentes espécies de parasitas intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* têm sido identificadas como patogênicas. Estes protozoários são transmitidos ao hospedeiro humano por meio da picada de insetos hematófagos, conhecidos como flebotomíneos. A quimioterapia é escassa, limitada e muito cara. Os fármacos disponíveis apresentam elevada toxicidade, bem como suscitam número elevado de casos de resistência. Considerando-se que a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas são extremamente necessários o objetivo deste trabalho foi contribuir com essa busca utilizando-se o método de modificação molecular, a latenciação. Tendo em vista que os dendrímeros têm sido muito utilizados como transportadores de fármacos, propôs-se a síntese de fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração de hidroximetilnitrofural (NFOH), composto que apresenta potencial atividade leishmanicida. Assim, pretendeu-se desenvolver fármacos dirigidos de NFOH, que apresentem ação seletiva nos macrófagos, devido à presença de manose na estrutura, além de fármacos dirigidos, que apresentem ação seletiva no parasita, devido à presença de inositol em sua estrutura. Variedade de métodos sintéticos foi utilizada com o intuito de obter os dendrímeros dirigidos propostos. Os estudos sintéticos desenvolvidos indicam a provável obtenção dos dendrímeros dirigidos de manose e de inositol, embora os produtos estejam impuros e sem o agente bioativo incorporado. A maior dificuldade encontrada foi a purificação dos compostos obtidos. Em adição, métodos de modelagem molecular foram empregados para compreender os mecanismos de liberação dos fármacos dendriméricos dirigidos de primeira geração. Características moleculares, tais como disponibilidade espacial e potencial eletrostático, foram avaliadas para predizer a região mais suscetível à ação enzimática com vistas à liberação do composto ativo.

SANTOS, S.S. **Potencial leishmanicides: synthesis study of first generation dendrimer targeted drugs with hydroxymethylnitrofurazone**. 2012. 200p. Dissertation – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, 2012.

ABSTRACT

Leishmaniasis is considered a superneglected tropical disease and affects primarily areas of extreme poverty. It represents an emergent illness with high morbidity and mortality. About 20 different species of intracellular parasites of *Leishmania* spp. have been identified as pathogenic. Those protozoans are transmitted to human hosts by means of the female phlebotomine sandflies bite. The chemotherapy is scarce, limited, and expensive. The drugs available can cause undesirable side effects and there are already reports of the increased number of drug resistance. Considering that, the discovery and the development of new leishmanicide agents are urgently needed, the objective of this work as to contribute to this search using the method of molecular modification, prodrug design. Taken into account that dendrimers can be used as drug carriers, the purpose of this work was the synthesis of first generation dendrimer targeted drugs of hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), that shows potential leishmanicide activity. Thus, we designed NFOH targeted drugs with selective action in macrophages, due to the presence of mannose in the structure, and also NFOH targeted drugs that present selectivity for the parasite, due to the presence of inositol in the structure. Several synthetic methods have been used with the aim of synthesizing the targeted dendrimers with NFOH. Synthetic studies suggested the targeted dendrimers of *D*-mannose and of *myo*-inositol have been obtained, although impure and without the bioactive agent. The major difficulty was the purification of the compounds. In addition, molecular modeling methods were applied to understand the bioactive compound releasing from the first generation leishmanicide targeted dendrimers. Molecular features as spatial hindrance and electrostatic potential were evaluated to predict which region would be the most available to an enzymatic action regarding the bioactive compound release.

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO**..... 02
1.1 Leishmaniose..... 02
1.1.1 Agente etiológico..... 03
1.1.2 Vetor e transmissão..... 05
1.1.3 Epidemiologia..... 06
1.1.4 Manifestações clínicas..... 09
1.1.4.1 Leishmaniose cutânea..... 11
1.1.4.2 Leishmaniose mucosa..... 12
1.1.4.3 Leishmaniose visceral..... 13
1.1.5 Quimioterapia..... 15
1.1.5.1 Fármacos utilizados..... 15
1.1.5.1.1 Antimoniais..... 16
1.1.5.1.2 Desoxicolato de anfotericina 18
1.1.5.1.3 Pentamidina..... 19
1.1.5.1.4 Miltefosina..... 20
1.1.5.1.5 Paromomicina..... 21
1.1.5.2 Compostos em estudo..... 22
1.1.5.2.1 Azóis..... 22
1.1.5.2.2 Alopurinol..... 22
1.1.5.2.3 Sitamaquina..... 23
1.1.5.2.4 Artemisinina..... 23
1.1.5.2.5 Atovaquona..... 24
1.1.5.2.6 Tafenoquina..... 24
1.1.5.2.7 Outros compostos..... 25
1.1.5.3 Nitro-heterocíclicos..... 25
1.1.5.3.1 Nitrofural..... 25
1.1.5.3.2 Hidroximetilnitrofural..... 26
1.1.6 Busca de vacinas..... 28
1.2 Dendrímeros..... 29
1.2.1 Aplicações..... 32
1.2.1.1 Dendrímeros no transporte de fármacos 33
1.2.1.1.1 Propriedades farmacocinéticas dos dendrímeros..... 37

1.2.2 Síntese dos dendrímeros..... 38
1.3 Modelagem molecular..... 40
1.4 Latenciação..... 43
1.5 Importância da manose no desenvolvimento de fármacos dirigidos potencialmente leishmanicidas..... 48
1.5.1 Glicoconjugados com manose..... 48
1.5.2 Receptores de manose..... 49
1.6 Importância do *mio*-inositol em dendrímeros potencialmente leishmanicidas..... 51
2 **OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA**..... 53
3 **MATERIAL E MÉTODOS**..... 58
3.1 Material..... 58
3.1.1 Reagentes e solventes..... 58
3.1.2 Equipamentos..... 59
3.1.3 *Softwares* para modelagem molecular..... 59
3.2 Métodos..... 60
3.2.1 Síntese..... 60
3.2.1.1 Síntese do derivado hidroximetilnitrofural (NFOH)..... 61
3.2.1.2 Síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético (ácido málico protegido)..... 61
3.2.1.3 Síntese dos fármacos dendriméricos dirigidos – método divergente..... 62
3.2.1.3.1 Síntese do intermediário I..... 62
3.2.1.3.2 Síntese do malato de inositol..... 71
3.2.1.3.3 Síntese do intermediário II..... 72
3.2.1.3.4 Desproteção do intermediário II, obtenção do intermediário III 73
3.2.1.3.5 Síntese do dendrímero dirigido com manose..... 73
3.2.1.3.6 Sintese do dendrímero dirigido com inositol..... 74
3.2.1.4 Síntese dos fármacos dendriméricos dirigidos – método convergente..... 74
3.2.1.4.1 Síntese do intermediário IV..... 74
3.2.2 Métodos de análise..... 76
3.2.2.1 Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)..... 76

3.2.2.2 Espectrometria no Infravermelho (IV)..... 76
3.2.2.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)..... 77
3.2.3 Modelagem molecular..... 77
3.2.3.1 Estudo de liberação dos dendrímeros dirigidos de primeira geração..... 77
4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**..... 80
4.1 Síntese..... 80
4.1.1 Síntese do derivado hidroximetilnitrofural (NFOH)..... 80
4.1.2 Síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético (ácido málico protegido)..... 83
4.1.3 Síntese dos fármacos dendriméricos dirigidos – método divergente..... 86
4.1.3.1 Síntese do intermediário I..... 86
4.1.3.1.1 Método A – DCC como agente condensante..... 86
4.1.3.1.2 Método B – EDC como agente condensante..... 101
4.1.3.1.3 Método C – método do anidrido misto..... 108
4.1.3.1.4 Método D – CDI como agente condensante..... 117
4.1.3.1.5 Método E – Esterificação de Fisher..... 123
4.1.3.1.6 Método F – cloreto de acila para esterificação..... 127
4.1.3.2 Síntese do malato de inositol..... 132
4.1.3.2.1 Desproteção do intermediário I (obtido com DCC)..... 132
4.1.3.2.2 Desproteção do intermediário I (obtido com EDC)..... 134
4.1.3.3 Síntese do intermediário II com DCC..... 137
4.1.3.4 Desproteção intermediário II, obtenção do intermediário III..... 139
4.1.3.5 Síntese do dendrímero dirigido com manose..... 141
4.1.3.5.1 Ligação de manose ao intermediário III..... 141
4.1.3.6 Síntese do dendrímero dirigido com inositol..... 144
4.1.3.6.1 Ligação de inositol ao intermediário III..... 144
4.1.4 Síntese dos fármacos dendriméricos dirigidos – método convergente..... 146
4.1.4.1 Síntese do intermediário IV..... 146
4.1.4.1.1 Método G – utilizando NFOH como material de partida..... 146
4.1.4.1.2 Esterificação *in situ*..... 149

4.2 Modelagem molecular..... 152
4.2.1 Estudo de liberação dos dendrímeros dirigidos de primeira geração..... 152
5 **CONCLUSÕES**..... 170
6 **PERSPECTIVAS**..... 172
7 **REFERÊNCIAS**..... 173
APÊNDICE A..... I
ANEXO I – Instruções para a banca examinadora..... LXXXII
ANEXO II – Atividades acadêmicas desenvolvidas..... LXXXIV

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Descobrir consiste em olhar para o que todos veem e pensar algo diferente.

Roger Von Oetch

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

As primeiras observações e descrições do gênero *Leishmania* efetuaram-se no fim do século XIX. Borovsky (1898) identificou este parasita em um paciente com a forma cutânea da doença, em Tachkent (Ásia Central). Leishmann e Donovan redescreveram o parasita de um caso de calazar indiano, em 1903. Mas foi em 1909 que Lindenberg, Carini e Paranhos demonstraram a presença dos parasitas nas lesões de pacientes brasileiros. Gaspar Vianna deu-lhe o nome de *Leishmania braziliensis* e, em 1912, descobriu a ação curativa do tártaro emético, mudando definitivamente a sorte dos pacientes com leishmaniose em todo o mundo (REY, 2001).

O termo leishmaniose determina um grupo de doenças causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (MACHADO *et al*., 2009; BOER *et al*., 2011). Trata-se de zoonose complexa, causada por 20 espécies diferentes destes parasitas. Enfermidade com amplo espectro e diferentes manifestações clínicas e epidemiológicas, é doença emergente, com alta morbidade e mortalidade nos países tropicais, subtropicais e Bacia do Mediterrâneo (SUCRE *et al*., 1997; LINDOSO, LINDOSO, 2009; FARIA *et al*., 2011; SEN, CHATTERJEE, 2011; DUTCHIE *et al*., 2012). A leishmaniose pode se apresentar na forma tegumentar (classicamente dividida em cutânea, mucosa e mucocutânea) ou na forma visceral e vem sendo reconhecida como doença oportunista associada à AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*), o que favorece manifestações clínicas graves e falência terapêutica. Estas manifestações podem variar de simples lesões cutâneas de autorresolução à doença visceral fatal (MAYRINK *et al*., 2006; COELHO, TOSI, COTRIM, 2004; SUZUKI *et al*., 2008; NAGILL, KAUR, 2011; FIDALGO, GILLE, 2011; CROFT, OLLIARO, 2011).

Estas infecções têm maior prevalência em países em desenvolvimento, onde a mortalidade é afetada pela falta de acesso aos cuidados de saúde. Muitos dos medicamentos disponíveis para tratar essas doenças são caros, apresentam difícil administração e muitos efeitos tóxicos. Além disso, existe a falta de vacinas eficazes para a prevenção destas enfermidades (DENNY *et al*., 2006; SEN, CHATTERJEE, 2011; BOER *et al*., 2011; TIUMAN *et al*., 2011).

1.1.1 *Agente etiológico*

A leishmaniose é causada por parasitas da família *Trypanosomatidae,* ordem Kinetoplastidae, gênero *Leishmania* (Figura 1), subgênero *Leishmania* (CAVILLO *et al.*, 2011; YONEYAMA *et al.*, 2006; UENO *et al.*, 2009; SEN, CHATTERJEE, 2011; NAGILL, KAUR, 2011).

Esse protozoário é um dos principais agentes causadores de doença no ser humano, sendo parasita intracelular obrigatório, que se multiplica nas células do sistema fagocítico mononuclear (principalmente macrófagos) dos mamíferos suscetíveis (SOUZA *et al.*, 2010; TULADHAR, NATARAJAN, SATOSKAR, 2011; MURRAY, 2012).

A leishmaniose é uma doença que envolve complexa interação entre o patógeno, vetores artrópodes, reservatório (animal pequeno, por exemplo, o cão) e o ser humano (SOUZA, DAY, 2011). Em seu ciclo evolutivo apresenta duas formas principais: amastigota e promastigota. A forma promastigota é flagelada, alongada e móvel e apresenta vida extracelular. Esta é a forma infecciosa, que está presente no intestino de flebotomíneos. A outra forma de *Leishmania* é a amastigota, que tem vida intracelular obrigatória em tecidos de hospedeiros mamíferos, apresenta formato arredondado e é encontrada no tecido do hospedeiro em fagolisossomos, principalmente nos macrófagos (FARIA *et al.*, 2011; YONEYAMA *et al.*, 2006; TIUMAN *et al.*, 2011).

A capacidade de sobrevivência da *Leishmania,* tanto no vetor flebotomíneo como no fagolisossomo de macrófagos em mamíferos, está associada à expressão de glicoconjugados em sua superfície, como glicosilfosfatidilinositol (UENO *et al.*, 2009).

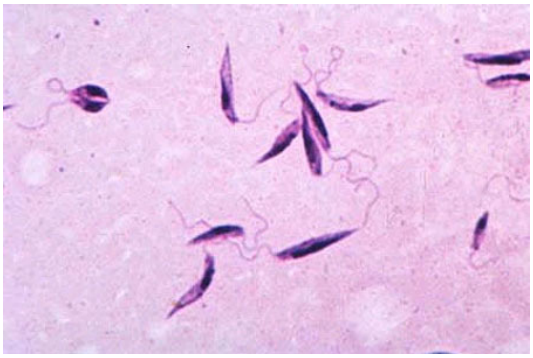


Figura 1: *Leishmania* na forma promastigota.
Fonte: http://www.fiocruz.br/ccs/media/leishmaniose.jpg

O ciclo evolutivo (Figura 2) se desenvolve da seguinte forma: ao se alimentar em animal infectado (reservatório), o inseto vetor ingere sangue juntamente com células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM) parasitado com formas amastigotas da *Leishmania*. No tubo digestivo do inseto, estas formas são transformadas em promastigotas, que se multiplicam por divisão binária e, assim, migram até a probóscida do mosquito. Pequenos mamíferos como roedores e cães, em geral, servem como reservatórios desses patógenos e, neste contexto, o homem é hospedeiro acidental (SERVICE *et al.,* 2006; SOUZA *et al*., 2010; HARHAY *et al*., 2011).

As leishmanias na forma promastigota são inoculadas pela picada do inseto vetor, que injeta parasitas na pele do hospedeiro. O sistema imunológico estimula o deslocamento de células inflamatórias para o local da picada, principalmente macrófagos e neutrófilos. Os promastigotas podem sofrer ação lítica do sistema complemento, sendo destruídos pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Entretanto, estas formas podem aderir à superfície do macrófago e ser fagocitadas. Dentro do vacúolo parasitóforo (fagolisossoma) elas perdem o flagelo e se transformam em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária. Os amastigotas, ao contrário dos promastigotas, mostram alta atividade enzimática, são capazes de degradar metabólitos oxidativos tóxicos do macrófago e, também, são altamente adaptados ao pH baixo do fagolisossoma. Nesta forma, sobrevivem e se multiplicam no interior dos vacúolos fagocíticos, promovendo o rompimento do macrófago e gerando a liberação de novos amastigotas, que serão fagocitados por outros macrófagos. Os macrófagos infectados produzem, de forma exacerbada, quimiotaxinas, que irão atrair novos macrófagos, os quais serão parasitados criando, dessa forma, um ciclo que irá auxiliar na multiplicação exponencial do parasita. Este estágio é de natureza crônica e pode perdurar por meses a anos sem sinais e sintomas evidentes, dependendo da suscetibilidade e estado imunológico do hospedeiro (FARIA *et al*., 2011; YAO, 2010; SMITH *et al*., 1997; SEN, CHATTERJEE, 2011; TULADHAR, NATARAJAN, SATOSKAR, 2011).

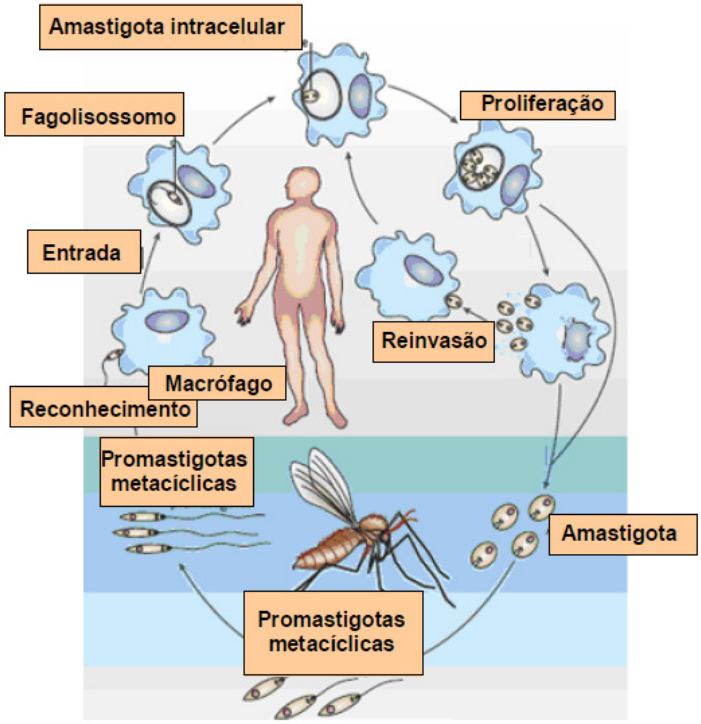


Figura 2: Ciclo evolutivo do parasita (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

.

1.1.2 *Vetor e transmissão*

A transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos. Os vetores que promovem a transmissão do parasita são mosquitos hematófagos do gênero *Phlebotomus,* responsável pela transmissão da doença na Ásia, e o gênero *Lutzomyia* (Figura 3), na América. A doença é transmitida aos seres humanos por, aproximadamente, 30 espécies de mosquitos flebotomíneos. No Brasil, há 16 espécies de *Lutzomyia* identificadas como transmissoras da doença (CHAPPUIS *et al.*, 2007; FRÉZARD, DEMICHELLI, RIBEIRO, 2009; AMORA *et al.*, 2009; NAGILL, KAUR, 2011; HOTEZ, SAVIOLI, FENWICK, 2012).

Figura 3: Mosquito *Lutzomyia* vetor da leishmaniose.

Fonte: http://www.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm

As fêmeas do gênero *Lutzomyia* medem de 2 a 3 milímetros e são os vetores responsáveis pela transmissão da doença. Este mosquito possui hábitos vespertinos e matutinos, períodos em que apresenta maior atividade (MAURER, DONDJI, STEBUT, 2009; PAILA, SAHA, CHATTOPADHYAY, 2010; ROMERO, BOELAERT, 2010; SEN, CHATTERJEE, 2011; NAGILL, KAUR, 2011; DUTCHIE *et al*., 2012).

O vetor habita em matas, florestas secundárias e áreas de rochas calcárias. Entretanto, fatores como o desmatamento e a ocupação humana desordenada promoveram adaptações destes vetores, trazendo-os para áreas urbanas habitadas. O mosquito *Lutzomyia longipalpi* coloniza o ambiente peridomiciliar, sendo capaz de se adaptar a altas temperaturas e baixa umidade. As maiores taxas de transmissão ocorrem durante as chuvas. A expansão da leishmaniose resultou no estabelecimento de novas áreas endêmicas, o que demonstra a adaptabilidade do vetor. Assim, a doença que era praticamente rural passou a ter distribuição mais ampla em áreas urbanas (MARZOCHI *et al*., 2009; AMORA *et al*., 2009; SOUZA, DAY, 2011).

Outro mecanismo de transmissão possível é a transmissão direta, ou seja, sem flebotomíneos. Apesar da transmissão pelo mosquito ser a mais comum, a contaminação pode ocorrer, também, por transfusão sanguínea e por compartilhamento de seringas entre usuários de drogas (MACHADO *et al*., 2009; SERVICE *et al.,* 2006; ROMERO, BOELAERT, 2010; HARHAY *et al*., 2011).

1.1.3 *Epidemiologia*

A leishmaniose é amplamente distribuída pelo mundo, prevalente na África, América Latina, Ásia, Bacia do Mediterrâneo e Oriente Médio (Figura 4). Depois da malária, a leishmaniose é a doença parasitária que provoca mais mortes no mundo. Esta enfermidade é endêmica em 88 países, 72 deles em desenvolvimento, nos quais há cerca de 350 milhões de pessoas expostas à doença. A incidência mundial está aumentando e é uma das doenças consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como negligenciada (WHO, 2012a; LINDOSO, LINDOSO, 2009; ALAKURTTI *et al*., 2010; SHARMA, SINGH, 2008; SEN, CHATTERJEE, 2011; BOER *et al*., 2011; DUTCHIE *et al*., 2012). É assim denominada devido ao baixo interesse financeiro que desperta em indústrias farmacêuticas, serviços de saúde pública e outras autoridades

para o investimento em atividades de investigação, controle e tratamento (REITHINGER *et al.*, 2007).

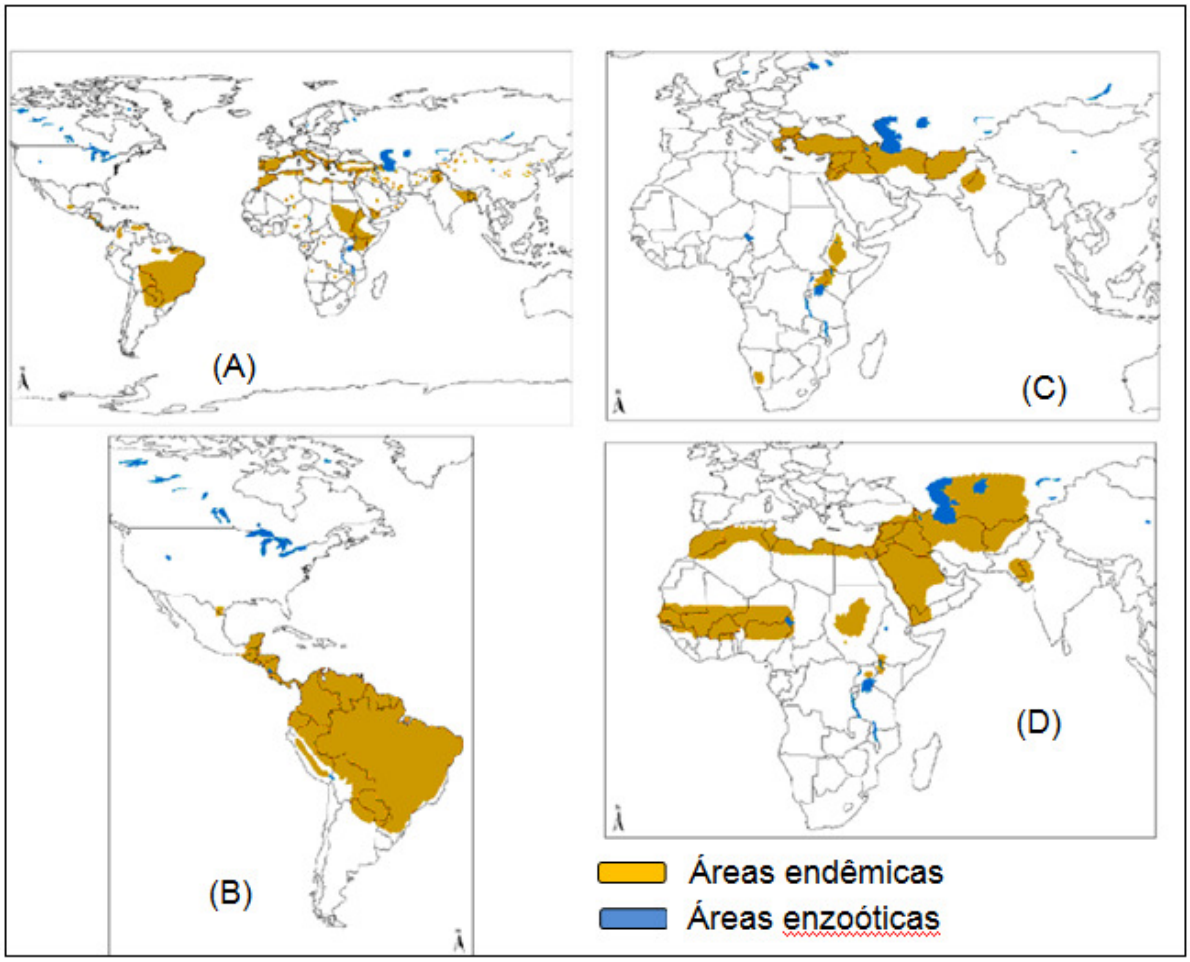


Figura 4: Distribuição geográfica da (A) leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo, (B) leishmaniose tegumentar no Novo Mundo, (C) leishmaniose cutânea no Velho Mundo causada por *L. aethiopica* e espécies afins e (D) leishmaniose cutânea no Velho Mundo provocada por *L. major.*

Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html (2012b)

A prevalência estimada das leishmanioses no mundo é de 12 milhões de casos. O número preciso de ocorrências é desconhecido devido à subnotificação, pois a notificação compulsória ocorre em apenas 40 dos 88 países endêmicos. Estima-se que ocorram entre 1 e 2 milhões de casos novos e 200.000 óbitos por ano. Cinco países concentram 90% dos casos: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2012a; GACHET *et al.*, 2010; CAVILLO *et al.*, 2011; NAGILL, KAUR, 2011; HOTEZ, SAVIOLI,

FENWICK, 2012). As mudanças climáticas, desmatamento, urbanização desordenada, condições socioeconômicas, migração de pessoas para áreas endêmicas e coinfecção com o vírus HIV (*Human immunodeficiency virus)* são fatores que favorecem a expansão e propagação da leishmaniose (LINDOSO, LINDOSO, 2009; LACKOVIC *et al.*, 2010; MARZOCHI *et al.*, 2009; NAGILL, KAUR, 2011; SOUZA, DAY, 2011).

No Brasil, é uma antropozoonose de notificação compulsória, cuja importância é crescente. Aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose visceral registrados no continente americano ocorrem no Brasil. Estima-se que aconteçam cerca de 28 mil novos casos ao ano, com distribuição geográfica entre o norte da Amazônia e a região sudeste do País, incluindo a região centro-oeste e com predomínio no nordeste brasileiro com 77% dos casos. Os estados mais afetados são Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí, que correspondem a 66% dos casos (REY, 2001; SOUZA *et al.*, 2010; MARZOCHI *et al.*, 2009; HARHAY *et al.*, 2011).

O parasitismo e a doença são observados em climas quentes, tropicais e subtropicais, nas Américas e na África, mas também em climas temperados do Mediterrâneo e da Ásia. Além disso, a tendência é ter um ciclo mais rural ou selvagem de transmissão. Nas regiões endêmicas, as condições socioeconômicas da população facilitam a maior exposição do indivíduo ao vetor, favorecendo o desenvolvimento da doença. A população suscetível é constituída, principalmente, de trabalhadores empenhados em obras de desbravamento, como a abertura de estradas, derrubadas para o aproveitamento agrícola do solo e outras finalidades, bem como de lenhadores, caçadores, garimpeiros, entre outros. Estão sujeitos ao mesmo risco os moradores destas regiões e um grupo em expansão tem sido os viajantes em busca do turismo ecológico, pois com o aumento das viagens internacionais, a leishmaniose está sendo transportada para áreas onde não se manifestava anteriormente (RANG, DALE, RITTER, 2001; MAURER, DONDJI, STEBUT, 2009; NAGILL, KAUR, 2011).

Quanto à leishmaniose visceral, aspecto novo e preocupante na epidemiologia é a urbanização da doença, que expandiu suas áreas de transmissão para as periferias dos grandes centros urbanos, como demonstram os surtos registrados em Teresina, Natal, São Luís, Belo Horizonte e Rio de Janeiro. O número de casos registrados em regiões urbanas está aumentando anualmente (Figura 5). A proporção de infectados

que desenvolvem sinais e sintomas da doença é de, aproximadamente, 18:1. O grupo etário mais acometido pela leishmaniose visceral se situa entre os 10 e 20 anos, mas tanto adultos quanto crianças são infectados, sendo de 4:1 a proporção de doença nos indivíduos do sexo masculino comparativamente ao do feminino (HARHAY *et al.*, 2011; AMATO NETO *et al.*, 2008). Segundo Markell, John e Krotoski (2003), esta é uma doença que afeta especialmente crianças. Entretanto, o que se observa na literatura é a controvérsia de informações com relação ao grupo etário mais acometido pela leishmaniose visceral, o que indica a necessidade de pesquisas para uniformização dos dados epidemiológicos desta doença.

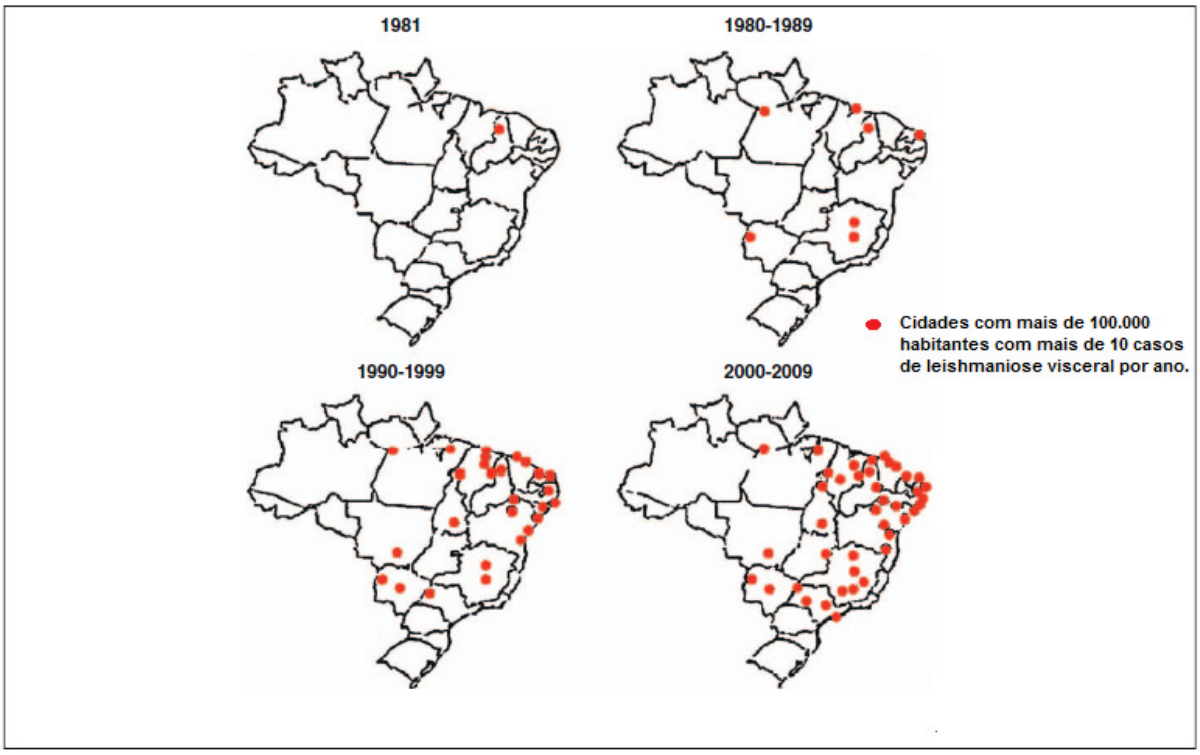


Figura 5: Expansão da leishmaniose visceral em regiões urbanas no Brasil, período de 1981-2009 (HARHAY *et al.*, 2011).

1.1.4 *Manifestações clínicas*

Como mencionado anteriormente, esta doença pode apresentar diferentes manifestações clínicas tais como a forma: cutânea, mucosa/mucocutânea, visceral e dérmica pós-calazar. O desenvolvimento de diferentes formas de leishmaniose está relacionado à espécie do parasita, resposta imunológica do hospedeiro e meio

ambiente envolvido (DUTCHIE *et al.*, 2012). A Tabela I apresenta as manifestações clínicas, cepas do protozoário e distribuição geográfica da leishmaniose.

Tabela I – Manifestações clínicas, estirpes de protozoários e países acometidos (DUTCHIE *et al.*, 2012)

Leishmaniose	***Leishmania sp.***	**Países acometidos**
Cutânea	Complexo *L. mexicana*	Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Estados Unidos, Guatemala, Guiana Francesa, México, Peru, Suriname e Venezuela
	Complexo *L. tropica*	Afeganistão, Azerbaijão, Índia, Irã, Iraque, Israel, Marrocos, Paquistão, Síria, Turquia e Uzbequistão
	Complexo *L. major*	Afeganistão, Arábia Saudita, Argélia, Azerbaijão, Burkina Faso, Camarões, Cazaquistão, Chade, Egito, Etiópia, Gâmbia, Gana, Geórgia, Guiné Bissau, Iêmen, Índia, Irã, Iraque, Israel, Jordânia, Kuwait, Líbia, Mali, Marrocos, Mauritânia, Mongólia, Níger, Nigéria, Omã, Paquistão, Quênia, Senegal, Síria, Sudão, Tunísia, Turquemenistão, Turquia e Uzbequistão
	Complexo *L. aethiopica*	Etiópia, Quênia e Uganda
	Complexo *L. braziliensis*	Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Guiana Francesa, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru e Venezuela
	Complexo *L. guyanensis*	Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Guiana, Guiana Francesa, Honduras, Nicarágua, Panamá, Peru, Suriname e Venezuela
Mucosa/ mucocutânea	Complexo *L. braziliensis*	Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Guiana Francesa, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru e Venezuela
	Complexo *L. guyanensis*	Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá

Tabela I – Manifestações clínicas, estirpes de protozoários e distribuição geográfica (DUTCHIE *et al.*, 2012) (cont.)

Leishmaniose	*Leishmania sp.*	Países acometidos
Visceral ou calazar	Complexo *L. donovani / L. chagasi*	Afeganistão, Albânia, Arábia Saudita, Argélia, Argentina, Armênia, Azerbaijão, Bangladesh, Bolívia, Bósnia, Brasil, Bulgária, Butão e Herzegovina, Cazaquistão, Chade, China, Chipre, Colômbia, Croácia, Djibuti, Egito, El Salvador, Eritréia, Eslovênia, Espanha, Etiópia, França, Gâmbia, Geórgia, Grécia, Guatemala, Honduras, Iêmen, Índia, Irã, Iraque, Israel, Itália, Jordânia, Líbano, Líbia, Macedônia, Malta, Marrocos, Mauritânia, México, Mônaco, Montenegro, Nepal, Nicarágua, Omã, Paquistão, Paraguai, Portugal, Quênia, Quirguistão, República Centro-Africana, Romênia, Senegal, Síria, Somália, Sri Lanka e Sudão
Dérmica pós-calazar	Complexo *L. donovani*	Bangladesh, China, Índia, Irã, Iraque, Nepal, Paquistão, Quênia e Sudão

1.1.4.1 *Leishmaniose cutânea*

A forma cutânea (Figura 6) pode ser de autorresolução, com imunidade de longa duração. Uma das variantes dessa leishmaniose é a mucocutânea, causada pela *Leishmania braziliensis*, que acomete pele e mucosas, formando úlcera. A doença é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões ulcerosas na pele, que perduram por vários meses e, na maioria dos casos, são resolvidas pela atividade de células T. A cura ocorre por reepitelização, com a formação de cicatrizes, muitas vezes, desfigurantes. No entanto, em pacientes com problemas na resposta imunológica, podem evoluir para doença crônica de longa duração, com o desenvolvimento de leishmaniose tegumentar ou leishmaniose cutânea difusa recorrente (EL-ON, 2009; ROMERO, MORILLA, 2008; GONZÁLEZ *et al.*, 2010; NAGILL, KAUR, 2011; SHARMA, SINGH, 2008; TULADHAR, NATARAJAN, SATOSKAR, 2011; BOER *et al.*, 2011).

Esta forma apresenta período de incubação que pode variar de 15 dias até três meses. A doença inicia-se com a formação de um nódulo cutâneo pruriginoso, que

progride para úlcera pouco dolorosa, arredondada ou oval, rasa, com os bordos elevados e fundo granuloso, exsudativo ou seco, com tamanho bastante variado, de poucos milímetros até mais de 10 cm (Figura 6). Pode progredir para lesões nodulares, que se estendem e disseminam por todo o corpo, em regiões como face, joelhos, tornozelos, cotovelos e dorso das mãos, causando hiperqueratose. O diagnóstico se dá pelas lesões sugestivas em pacientes de áreas endêmicas e com a identificação do parasita pelos métodos disponíveis. Nos casos de exame direto negativo ou ausência dos parasitas, os exames indiretos, como o teste imunológico de Montenegro (teste de hipersensibilidade retardada) e os exames sorológicos auxiliam no diagnóstico. As lesões podem cicatrizar espontaneamente, mas, em muitos casos dependendo da imunidade do indivíduo, isso não ocorre (MARKELL, JOHN, KROTOSKI, 2003; MAURER, DONDJI, STEBUT, 2009).

Figura 6: Lesão nodular provocada pela leishmaniose cutânea.
Fonte: http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/leish-fotos2.htm

1.1.4.2 *Leishmaniose mucosa*

O principal agente etiológico da leishmaniose mucosa é a *Leishmania braziliensis*, embora outras espécies já tenham sido implicadas como causadoras da doença. Esta forma de leishmaniose (Figura 7) é causada pela reativação de infecção latente, após a lesão cutânea primária, embora em alguns casos não haja histórico de infecção primária. Os principais locais de acometimento são o septo nasal e a região orofaríngea (SERVICE *et al.*, 2006; AMATO *et al.*, 2007). Esta forma da doença pode causar lesões terrivelmente mutilantes das partes moles do nariz, lábios, palato mole, que tende a se estender para as áreas vizinhas (MARKELL, JOHN, KROTOSKI, 2003).

A leishmaniose mucosa pode produzir doença inflamatória potencialmente fatal. Ocasiona resposta inflamatória intensa, com extensa destruição tecidual, habitualmente progressiva. Os sinais e sintomas de acometimento nasal são epistaxe, formação de crostas, saída de secreção, hiperemia e deformidade do local ou de regiões adjacentes à pele. Para fins de diagnóstico deve-se realizar biópsia ou raspagem das lesões ulceradas e examiná-las microscopicamente com lâminas coradas com Giemsa. Além disso, o material pode ser semeado em meio de cultura de NNN (*Novy-MacNeal-Nicolle*) ou podem-se realizar testes imunológicos, como a Reação de Montenegro. Devido a complicações, o tratamento deve ser iniciado imediatamente após o diagnóstico, com o objetivo de impedir possíveis lesões desfigurantes, distúrbios de alimentação e obstrução das vias aéreas (MAYRINK *et al.*, 2006; SHARMA, SINGH, 2008; AMATO *et al.*, 2007).

Figura 7: Lesão decorrente de leishmaniose mucosa (VELOZO *et al.,* 2006).

1.1.4.3 *Leishmaniose visceral*

Há estimativa de 500.000 novos casos e mais de 50.000 mortes pela doença ao ano. A migração, falta de medidas de controle e coinfecção com HIV são os principais fatores do aumento da incidência de leishmaniose visceral. Apesar de todas as formas de leishmaniose apresentarem consequências devastadoras, a leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença que, se não tratada, apresenta taxa de mortalidade de quase 100%. Também denominada *calazar*, é uma doença sistêmica, causada por *Leishmania donovani*, que parasita células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro. A doença apresenta período de incubação variável de 10 dias a três anos. Caracteriza-se, clinicamente, por febre alta de mais de duas semanas, abdômem edemaciado devido à hepatoesplenomegalia (Figura 8), anemia, hemorragias,

emagrecimento progressivo evidente, mucosas descoradas, manifestações intestinais (diarréia) e respiratórias (tosse). A doença pode ser rápida, levando o paciente à morte dentro de algumas semanas, principalmente se não tratada, ou também, assumir curso crônico. O diagnóstico pode ser realizado por exame direto em esfregaços de aspirado de medula óssea ou baço, com coloração de Giemsa, ou por técnicas sorológicas como imunofluorescência indireta e ensaios imunoenzimáticos (CHAPPUIS *et al.*, 2007; TEMPONE *et al.*, 2004; ROMERO, BOELAERT, 2010; NAGILL, KAUR, 2011; SOUZA, DAY, 2011; COTA, SOUSA, RABELLO, 2011).

A imunossupressão decorrente de infecções virais, como o HIV, aumentou a incidência de casos de leishmaniose visceral, como infecção oportunista. Além disso, os pacientes coinfectados têm redução da resposta terapêutica e favorecimento da reativação da leishmaniose. Adicionalmente, esta parasitose provoca evolução das condições clínicas da AIDS em indivíduos infectados. Outro grupo possivelmente afetado são os pacientes transplantados, que utilizam continuamente fármacos imunossupressores (MACHADO *et al.*, 2009; PALUMBO, 2008; PAILA, SAHA, CHATTOPADHYAY, 2010; COTA, SOUSA, RABELLO, 2011).

Figura 8: Sinais de hepatoesplenomegalia provocada pela leishmaniose visceral.
Fonte: http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/leish-fotos2.htm

1.1.5 Quimioterapia

1.1.5.1 *Fármacos utilizados*

O tratamento é baseado na utilização de fármacos leishmanicidas. A OMS e o Ministério da Saúde do Brasil recomendam os antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina, como fármacos de primeira escolha contra todas as formas de leishmaniose. Entre os fármacos considerados de segunda escolha estão anfotericina B, pentamidina e paromomicina (MAYRINK *et al.*, 2006; GONZÁLEZ *et al.*, 2010; NAGILL, KAUR, 2011; CROFT, OLLIARO, 2011; BOER *et al.*, 2011).

A variabilidade da eficácia dos fármacos para o tratamento da leishmaniose está relacionada às diferenças na sensibilidade das espécies de *Leishmania* aos fármacos existentes, às diferentes manifestações clínicas, ao estado imunológico do paciente e às propriedades farmacocinéticas dos fármacos (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; FIDALGO, GILLE, 2011).

Atualmente, existem 25 compostos e formulações disponíveis que apresentam atividade contra leishmaniose, mas apenas alguns são classificados como fármacos leishmanicidas para uso humano (FIDALGO, GILLE, 2011).

É notória a carência de investimento financeiro para investigação e pesquisa de fármacos para o tratamento da leishmaniose. Os fármacos utilizados no apresentam diversos problemas, incluindo: tratamentos prolongados, elevada toxicidade, baixa eficácia, alto custo, limitada disponibilidade de diagnóstico e resistência do parasita. Estima-se que 50% dos pacientes não têm acesso adequado a diagnóstico e tratamento. Tais fatos ressaltam a necessidade de desenvolvimento de terapias inovadoras e alternativas para o controle e terapêutica da leishmaniose (DENNY *et al.*, 2006; SCHRIEFER, WILSON, CARVALHO, 2008; TEMPONE *et al.*, 2010; BOER *et al.*, 2011; DUTCHIE *et al.*, 2012).

1.1.5.1.1 Antimoniais

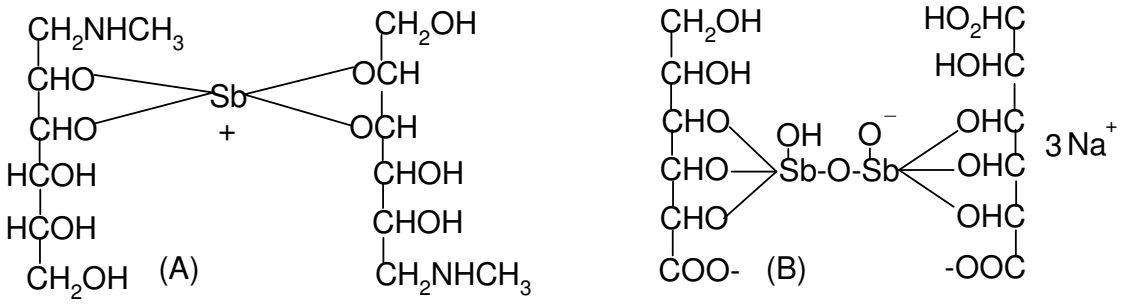


Figura 9: Estrutura (A) antimoniato de meglumina e (B) estibogluconato de sódio.

Na atualidade, existem somente dois antimoniais em uso clínico, ambos pentavalentes: o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio (Figura 9), utilizados desde a década de 1940. Os antimoniais são os agentes mais eficazes na atualidade para tratar a doença, no entanto, apresentam difícil administração, o tratamento é lento, de alto custo e potencialmente tóxico (COELHO, TOSI, COTRIM, 2004; TAVARES, 2001; FRÉZARD, DEMICHELI, RIBEIRO, 2009; CROFT, OLLIARO, 2011; BOER *et al.*, 2011).

Sugere-se que, *in vitro*, os macrófagos promovam o acúmulo de antimoniais pentavalentes. O mecanismo de ação ainda necessita ser esclarecido, mas se acredita que os antimoniais pentavalentes inibam enzimas da via glicolítica e da oxidação de ácidos graxos do parasita. Outra hipótese de mecanismo aventada é a de ligação com sítios sulfidrílicos, resultando na morte dos protozoários. Estudos recentes sugerem que os antimoniais pentavalentes atuem como pró-fármacos, sendo convertidos em antimoniais trivalentes. Os antimoniais trivalentes inibem a enzima tripanotiona redutase *in vitro* e, desta forma, induzem a perda de tióis intracelulares, promovendo desequilíbrio fatal na homeostase desses grupos, levando ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Evidências recentes indicam que os antimoniais matam os parasitas por apoptose (FRÉZARD, DEMICHELI, RIBEIRO, 2009; TEMPONE *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2010).

O **antimoniato de meglumina (Glucantime®)** é utilizado na dose de 15–20 mg/kg/dia, por 20 a 40 dias, de acordo com a indicação, por via intravenosa ou intramuscular. Vale ressaltar que as aplicações intramusculares são dolorosas e podem

formar abscessos frios, além do risco de infecção secundária. Os efeitos colaterais sistêmicos exigem supervisão médica (TAVARES, 2001; MALTEZOU, 2010; FRÉZARD, DEMICHELI, RIBEIRO, 2009).

O **estibogluconato de sódio** é menos tóxico que os antimoniais mais antigos, sendo o mais eficaz entre os fármacos disponíveis para o tratamento de leishmaniose. A dose recomendada é de 20 mg/kg/dia, durante 20 dias, por via intravenosa ou intramuscular (MARKELL, JOHN, KROTOSKI, 2003; TAVARES, 2001; MALTEZOU, 2010; MURRAY, 2012).

Os efeitos colaterais são bem conhecidos e estão relacionados principalmente com a sua toxicidade cardíaca, hepática, pancreática e renal. Antimoniais pentavalentes não são dialisáveis, gerando acúmulo em indivíduos com nefropatias e arritmias graves (AMATO NETO *et al.*, 2008). São os efeitos mais comuns: artralgia, mialgia, cefaléia, anorexia, leucopenia, aumento de uréia e creatinina, neuropatias, hemorragias, arritmias cardíacas e pancreatite química. Efeitos colaterais menos frequentes são morte súbita e herpes zoster. Estes medicamentos são mal-absorvidos pelo sistema digestivo, provocando irritação na mucosa intestinal, promovendo náuseas, vômitos, e estimulam, reflexamente, a salivação e as glândulas brônquicas, aumentando a expectoração (TAVARES, 2001; CHAPPUIS *et al.*, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007). Esses fármacos são contraindicados em casos de gestação, cardiopatias e hepatopatias (REY, 2001; MURRAY, 2012).

Os resultados do tratamento nem sempre são satisfatórios e a falta de resposta terapêutica aos antimoniais é elevada, pois a resistência a estes agentes está aumentando. A OMS recomenda para o leste da África, o uso da associação de paromomicina e antimoniais pentavalentes, como tratamento de primeira escolha para leishmaniose (TRACY *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2010; BOER *et al.*, 2011).

1.1.5.1.2 Desoxicolato de anfotericina

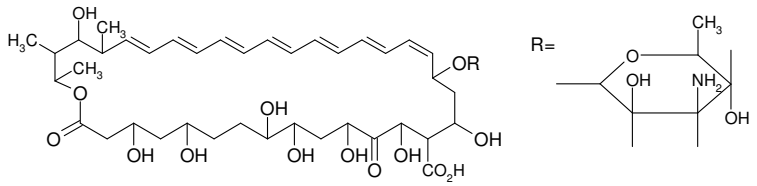


Figura 10: Estrutura da anfotericina B.

Os primeiros relatos da eficiência da anfotericina B (Figura 10) no tratamento da leishmaniose são de Lacaz e Sampaio, no final da década de 1950, e no início da década de 1960 (AMATO NETO *et al.*, 2008). Tratamento alternativo ou de segunda escolha para leishmaniose, a anfotericina B pertence ao grupo de antibióticos poliênicos isolados de diferentes espécies de *Streptomyces* (TRACY *et al.*, 2003; EL-ON, 2009; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; CROFT, OLLIARO, 2011; TIUMAN *et al.*, 2011).

A anfotericina B lipossômica mostrou-se eficaz no tratamento de casos de leishmaniose resistente aos antimoniais no Mediterrâneo, França, Índia e Brasil, além de apresentar melhor perfil de segurança (COELHO, TOSI, COTRIM, 2004; SANTOS *et al.*, 2008; ALAKURTTI *et al.*, 2010). As formulações lipídicas de anfotericina B podem ser especialmente úteis aos pacientes que não respondem ao tratamento antimonial ou que não conseguem tolerar os cursos prolongados do tratamento parenteral. No entanto, o alto custo desta apresentação farmacêutica dificulta o seu uso em populações carentes (TRACY *et al.*, 2003; PALUMBO, 2008; CROFT, OLLIARO, 2011; TIUMAN *et al.*, 2011; MURRAY, 2012).

Este fármaco interage através de sua ligação com esteróis (ergosterol ou episterol) presentes na membrana plasmática de *Leishmania*, causando aumento de permeabilidade, promovendo a perda de nutrientes, lise celular, com consequente morte do parasita. É seletivo devido à maior afinidade de anfotericina B por ergosterol, esterol predominante nestes protozoários, e não ao colesterol, esterol predominante nas células de mamíferos. A interação da anfotericina B com o ergosterol gera canais transmembranas, que induzem alterações de permeabilidade a cátions, água, glicose e que afetam enzimas de membrana. A anfotericina B é o fármaco de escolha para o

tratamento da leishmaniose durante a gestação (AMATO NETO *et al.*, 2008; PAILA, SAHA, CHATTOPADHYAY, 2010; FIDALGO, GILLE, 2011).

A dose indicada para o tratamento de leishmaniose é de 0,2 a 1 mg/kg/dia, administrada em 14 dias consecutivos. Esta medicação é contraindicada em indivíduos com cardiopatias e nefropatias. Apresenta como efeitos colaterais febre, calafrios, vômitos, cefaléia, hipotensão, astenia, dores musculares e articulares, anemia, leucopenia, flebite, depressão da medula óssea, hipocalemia e nefrotoxicidade (REY, 2001; MARKELL, JOHN, KROTOSKI, 2003; MALTEZOU, 2010; TIUMAN *et al.*, 2011).

1.1.5.1.3 Pentamidina

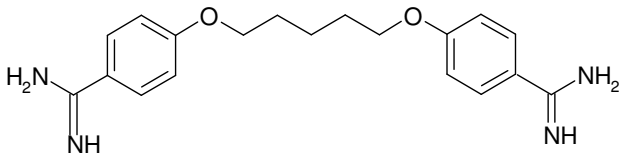


Figura 11: Estrutura da pentamidina.

A pentamidina (Figura 11) é uma diamidina aromática, carregada positivamente, e mais utilizada devido à sua estabilidade, solubilidade em água e menor toxicidade comparada aos demais fármacos desta classe. Considerada como fármaco de segunda escolha devido aos efeitos adversos provocados, é tóxica para diferentes protozoários. É utilizada como alternativa aos pacientes que não respondem ao tratamento com antimoniais ou formulações lipídicas de anfotericina B (COELHO, TOSI, COTRIM, 2004; SERVICE *et al.*, 2006; TEMPONE *et al.*, 2004; TIUMAN *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação é desconhecido, mas há a proposição de que a pentamidina interfira na síntese de poliaminas de DNA, alterando morfologicamente o cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial. A dose recomendada no tratamento é de 2 a 4 mg/kg/dia, por via intramuscular ou intravenosa, diariamente ou em dias alternados, com o total de 12 a 15 aplicações. É contraindicada em casos de gravidez, diabetes, nefropatias e cardiopatias (MARKELL, JOHN, KROTOSKI, 2003; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; FIDALGO, GILLE, 2011).

O isetionato de pentamidina pode causar dispnéia, anorexia, astenia, náuseas, dor abdominal, hepatite, taquicardia, vômitos, cefaléia, hipoglicemia, hipotensão durante a infusão, aumento de uréia e creatinina, síncope, diabetes, leucopenia e pancreatite. É capaz de se depositar em vários órgãos, sendo acumulado principalmente no fígado, rins, baço e glândulas suprarrenais (TAVARES, 2001; RANG, DALE, RITTER, 2001).

1.1.5.1.4 Miltefosina

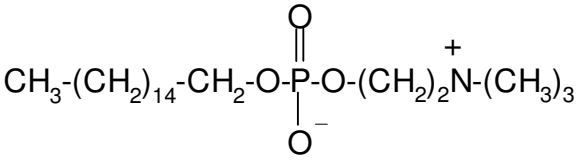


Figura 12: Estrutura da miltefosina.

Miltefosina (Figura 12), derivado hexadecilfosfocolina, foi originalmente desenvolvida como fármaco com atividade antitumoral. Estudos mostraram que este fármaco é altamente ativo contra *Leishmania*, apresentando bons resultados para o tratamento em crianças e em pacientes resistentes aos fármacos atualmente disponíveis (TEMPONE *et al.*, 2010; MALTEZOU, 2010; SANTOS *et al.*, 2008; TIUMAN *et al.*, 2011).

A miltefosina foi o primeiro fármaco de uso oral aplicado no tratamento da leishmaniose. O seu mecanismo de ação ainda não é bem definido, no entanto, sabe-se que esse agente bioativo atua em enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, bloqueando a síntese e alterando a composição da membrana do parasita. Pesquisas mostram este como composto promissor para o tratamento desta doença, porém são necessários mais estudos para verificar sua eficiência no combate às espécies de *Leishmania* existentes no Brasil. O uso de miltefosina não é recomendado para gestantes e lactantes, devido aos seus efeitos teratogênicos. A dose recomendada é de 150 mg ao dia, por via oral durante 28 dias. Fármaco bem absorvido e distribuído apresenta longa meia-vida (150 horas), o que pode favorecer o surgimento de resistência. Estudos mostram a miltefosina como alternativa para o tratamento de pacientes coinfectados com HIV (EL-ON, 2009; ALAKURTTI *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2008; CROFT, OLLIARO, 2011; MURRAY, 2012).

Outras alquilfosfocolinas tais como, edelfosina e ilmofosina, têm, também, apresentado potente atividade antiparasitária *in vitro* (TIUMAN *et al.*, 2011).

1.1.5.1.5 Paromomicina

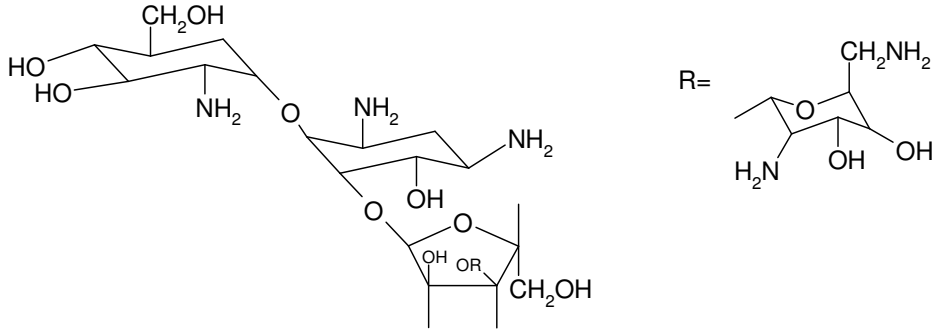


Figura 13: Estrutura da paromomicina.

É um antibiótico aminoglicosídico (Figura 13), isolado de culturas de *Streptomyces rimosus*, estruturalmente relacionado com a neomicina. Tem-se mostrado eficaz em alguns casos de leishmaniose visceral e cutânea. É utilizada em casos de resistência aos outros tratamentos, apesar da toxicidade ao hospedeiro. A dose recomendada no tratamento é de 20 mg/kg/dia, por via intramuscular, durante 20 dias consecutivos. Apresenta efeitos colaterais como: aumento de transaminases hepáticas, nefrotoxicidade, desconforto gastrintestinal, diarréia e ototoxicidade, podendo causar surdez irreversível. Este fármaco é contraindicado na gravidez. Seu mecanismo de ação é desconhecido, mas acredita-se que atue na síntese protéica e na alteração da fluidez e permeabilidade da membrana do parasita (TRACY *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008; MALTEZOU, 2010; AMATO NETO *et al.*, 2008; TIUMAN *et al.*, 2011).

1.1.5.2 *Compostos em estudo*

1.1.5.2.1 Azóis

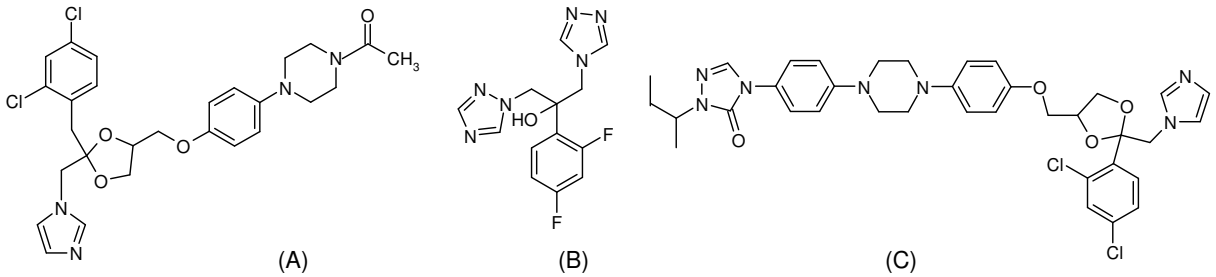


Figura 14: Estrutura (A) cetoconazol, (B) fluconazol e (C) itraconazol.

A biossíntese de ergosterol, principal esterol em *Leishmania* spp., é um alvo importante deste protozoário. Os azóis (por exemplo, cetoconazol e itraconazol) inibem a enzima 14α-esterol desmetilase, inibindo a biossíntese de esteróis (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; CROFT, OLLIARO, 2011).

Alguns fármacos estão em estudo para administração oral, como cetoconazol, itraconazol e fluconazol (Figura 14), isoladamente ou em combinação, e têm apresentado níveis variáveis de eficácia oral (EL-ON, 2009; REITHINGER *et al.*, 2007).

1.1.5.2.2 Alopurinol

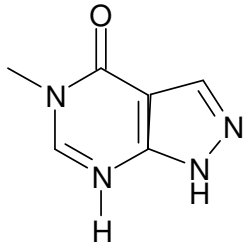


Figura 15: Estrutura do alopurinol.

Alopurinol (Figura 15), inibidor da enzima xantina oxidase, mostrou-se eficaz no tratamento da leishmaniose. Acredita-se que o alopurinol iniba as enzimas da via de recuperação de purinas em *Leishmania*, envolvidas na conversão de análogos ribonucleosídeos e na incorporação de RNA. Entretanto, estudos comparativos

demonstraram variações na sensibilidade de promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* ao alopurinol (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; AMATO NETO *et al.*, 2008; CROFT, OLLIARO, 2011).

1.1.5.2.3 Sitamaquina

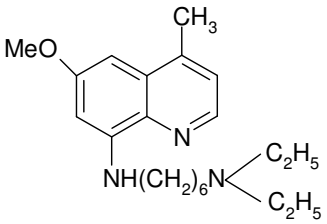


Figura 16: Estrutura de sitamaquina.

Sitamaquina (Figura 16) é análogo das 8-aminoquinolinas e está em ensaios clínicos de fase II para o tratamento da leishmaniose. A dose investigada é de 2 mg/kg/dia, por via oral, porém mais estudos são necessários para definir a dose ideal. Trata-se de fármaco de amplo espectro, que apresentou índice de cura de 90%, incluindo atividade contra leishmaniose visceral. Apresenta como efeitos adversos: dor abdominal, dor de cabeça e efeitos renais graves (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; CHAPPUIS *et al.*, 2007; CROFT, OLLIARO, 2011; TIUMAN *et al.*, 2011).

1.1.5.2.4 Artemisinina

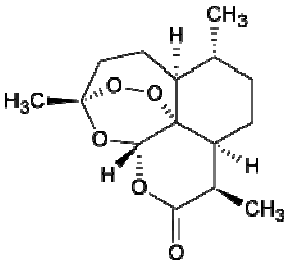


Figura 17: Estrutura de artemisinina.

Artemisinina (Figura 17), lactona sesquiterpênica isolada de *Artemisia annua*, fármaco antimalárico que tem demonstrado atividade leishmanicida contra as formas

promastigotas e amastigotas. A ação contra *Leishmania* foi mediada por apoptose e alterações na membrana mitocondrial do parasita (FIDALGO, GILLE, 2011).

1.1.5.2.5 Atovaquona

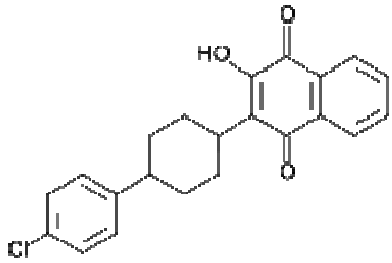


Figura 18: Estrutura de atovaquona.

Atovaquona (Figura 18), uma hidroxinaftoquinona, outro fármaco antimalárico que apresentou atividade contra *Leishmania infantum*, com IC_{50} de 15,2 µg/mL. Acredita-se que este composto atue como competidor de ubiquinona, inibindo o complexo citocromo BC1 mitocondrial do parasita, processo importante para produção de energia (FIDALGO, GILLE, 2011).

1.1.5.2.5 Tafenoquina

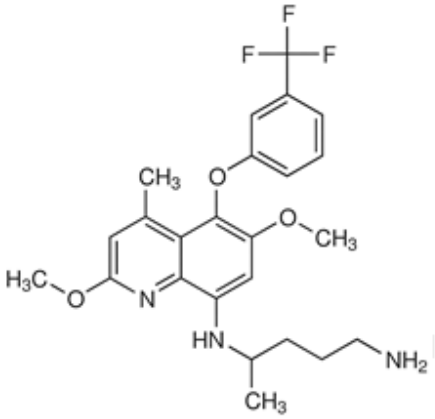


Figura 19: Estrutura de tafenoquina.

Tafenoquina (Figura 19), análogo 8-aminoquinolina da primaquina, composto em ensaio clínico (fase IIb/III) para ação antimalárica. Estudos mostraram potencial

atividade leishmanicida. Acredita-se que atue na fragmentação do DNA nuclear e na inibição do citocromo C redutase mitocondrial, promovendo, dessa forma, aumento na produção de radicais livres, com consequente apoptose (FIDALDO, GILLE, 2011).

1.1.5.2.6 Outros compostos

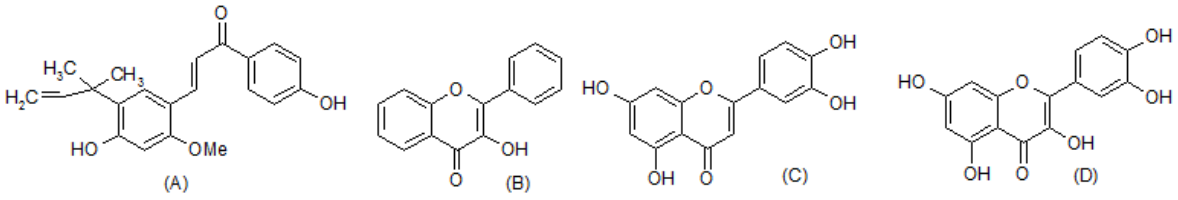


Figura 20: Estrutura (A) licochalcona A, (B) 3-hidroxiflavona, (C) luteolina e (D) quercetina.

As chalconas, como licochalcona A (Figura 20) e derivados sintéticos, exibem potente atividade leishmanicida. Estudos experimentais mostraram que estes compostos destroem a estrutura da mitocôndria e inibem a enzima fumarato redutase, importante para obtenção de energia (FIDALGO, GILLE, 2011).

Pesquisas mostram que os flavonóides (3-hidroxiflavona, luteolina e quercetina) (Figura 20) promovem alteração na estrutura da mitocôndria, devido a modificações no DNA mitocondrial e redução da produção de ATP (Adenosina trifosfato) (FIDALGO, GILLE, 2011).

1.1.5.3. *Nitro-heterocíclicos*

1.1.5.3.1 Nitrofural

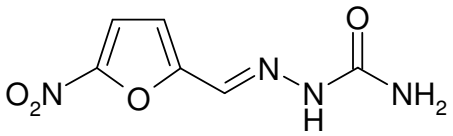


Figura 21: Estrutura do nitrofural.

Também denominado nitrofurazona, o nitrofural é a semicarbazida do nitrofuraldeído. Nitrofural (Figura 21) é um antimicrobiano eficaz contra bactérias Gram-positivas e gram-negativas, mas também apresenta atividade contra *Trypanosoma*

cruzi. Acredita-se, que a atividade tripanomicida pode estar relacionada à inibição de tripanotiona redutase, enzima chave no metabolismo oxidativo do parasita. Este composto poderia ser reduzido por esta enzima, atuando como inibidor enzimático, bloqueando, desta forma, a redução de dissulfeto de tripanotiona, substrato fisiológico do parasita. Apesar da toxicidade, compostos nitroaromáticos são geralmente muito ativos contra *T. cruzi* e têm sido considerados alvos importantes para modificação molecular (GUIDO *et al.*, 2001; GONÇALVES *et al.*, 1994).

O nitrofural é utilizado como adjuvante no tratamento de queimaduras, na profilaxia de infecções cutâneas e em casos de transplantes de pele. É, também, indicado para o tratamento de infecções de feridas e úlceras de pele causadas por microrganismos sensíveis e em infecções estafilocócicas. Seu uso por via tópica é seguro, eficaz, indolor e de fácil aplicação. É utilizado sistemicamente contra tripanossomíase africana em estágios avançados e refratários ao melarsoprol e ao nível hospitalar, com monitoramento do paciente. Apresenta como efeitos adversos após administração oral: náusea, vômitos, dores articulares, cefaléia e polineurite. Em muitos países, devido aos efeitos adversos, o nitrofural foi retirado do mercado farmacêutico e, em outros, como o Brasil, o uso é permitido apenas por via tópica (FRANÇA, 2012).

Ensaios *in vitro* realizados por Santos (2005) mostraram potencial atividade leishmanicida do nitrofural contra as formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. braziliensis* com valor de IC_{50} igual a 0,70 ±0,43 μM e 0,78 ±0,11 μM, respectivamente. Além disso, os estudos demonstraram que o nitrofural inibiu o crescimento das formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* com IC_{50} de 0,91 ±0,11 μM e 0,29 μM.

1.1.5.3.2 <u>Hidroximetilnitrofural</u>

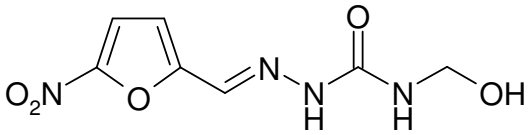


Figura 22: Estrutura de hidroximetilnitrofural.

Chung, em 1996, obteve o derivado hidroximetilado do composto nitrofural, o hidroximetilnitrofural (NFOH), como intermediário da síntese de pró-fármacos recíprocos de primaquina e nitrofural, potencialmente ativos em doença de Chagas. O NFOH (Figura 22) foi testado em cultura de células LLC-MK2 infectadas com formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi,* mostrando maior atividade tripanomicida em todas as formas parasitárias que seu precursor (nitrofural) e que o benznidazol. A maior atividade de NFOH pode estar relacionada à maior absorção do composto hidroxilado, devido ao aumento de sua hidrossolubilidade, uma vez que é 1,5 vez mais solúvel em água que seu precursor. Derivados hidroximetilados, via de regra, são mais hidrossolúveis que seus protótipos. A substituição em um dos nitrogênios da amina terminal pelo grupo hidroximetílico pode diminuir as ligações de hidrogênio intra ou intermoleculares, provocando redução do ponto de fusão e aumento da solubilidade aquosa (CHUNG *et al.*, 2003; BARBOSA *et al.*, 2007; BUNDGAARD, 1985). Os testes de mutagenicidade demonstraram que este composto foi menos tóxico, sendo quatro vezes menos mutagênico no teste de Ames que seu protótipo (CHUNG *et al.*, 2003; DAVIES *et al.*, 2010; GUIDO *et al.*, 2001). Além disso, mostrou-se ativo *in vivo*, comparativamente ao benznidazol, mas com toxicidade substancialmente menor (DAVIES *et al.*, 2010). O DL50 foi de 2 g/kg de peso.

Compostos nitro-heterocíclicos, dentre estes NFOH, são metabolicamente reduzidos liberando ânion superóxido, que promove danos ao DNA e posterior morte celular do parasita (HIRAKU *et al.*, 2004). Acredita-se que o derivado hidroximetilado possa atuar por inibição da tripanotiona redutase, enzima envolvida no sistema antioxidante do parasita, por meio da redução do grupo nitro (LA SCALEA *et al.*, 2001). Também, existem relatos de que o NFOH inibe a enzima cruzaína (valor de IC_{50} igual a 10,55 ±0,81 μM para o NFOH e de 22,83±1,2 μM para o nitrofural), por supressão da via metabólica de cisteíno-protease (TROSSINI *et al.*, 2010a).

Estes resultados sugerem que o NFOH é um composto promissor para novos ensaios como agente anti-*T.cruzi*.

Além da atividade tripanomicida, estudos realizados por Santos (2005) e Santos *et al.* (2010) mostraram que o NFOH apresenta atividade contra as formas promastigotas de *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis.* Os ensaios em cultura

das formas amastigostas fora dos macrófagos mostraram que o derivado é tão ativo para amastigotas quanto para promastigotas. Entretanto, NFOH não apresentou atividade contra as formas amastigotas dentro dos macrófagos, o que indica a dificuldade em penetrar no macrófago, mas não de atuar sobre o parasita intracelular. Esta problemática revela a importância do planejamento de fármacos dirigidos aos macrófagos, que podem promover o aumento da captação intracelular de NFOH, permitindo sua atuação sobre as formas intracelulares.

1.1.6 Busca de vacinas

A vacinação é uma grande promessa para o controle da leishmaniose. A utilização da vacina é muito mais vantajosa, comparativamente ao tratamento quimioterápico, pois induz o efeito prolongado e pode ser administrada para ação profilática e terapêutica. Além disso, a vacina não apresenta o problema de resistência, como acontece com a quimioterapia. Embora os consideráveis avanços com relação à compreensão dos mecanismos imunológicos de candidatos a antígenos potenciais, incluindo: parasitas mortos ou atenuados, proteínas puras ou recombinantes de *Leishmania*, imunomoduladores, entre outros agentes antigênicos, ainda não existe vacina eficaz contra qualquer forma de leishmaniose humana. Ponto que merece destaque é a imunidade adquirida contra reinfecção por pessoas que já contraíram a doença, o que demonstra a possibilidade de desenvolvimento de vacina contra esta enfermidade (SOUZA, DAY, 2011; NAGILL, KAUR, 2011; FIDALGO, GILLE, 2011; DUTCHIE *et al.*, 2012).

Atualmente, existe apenas uma vacina registrada contra a leishmaniose canina, composta pelo antígeno não patogênico, complexo glicoprotéico ligante de fucose e manose (FML), chamada Leishmune®. No Brasil, a vacinação preventiva de cães, como medida de controle, promoveu redução da incidência de leishmaniose canina e humana. Estudos mostraram que esta vacina foi capaz de aumentar a proporção de cães com resposta imunológica contra o parasita *Leishmania*, além de diminuir os reservatórios de transmissão e, assim, reduzir o risco de transmissão de leishmaniose aos seres humanos (SOUZA, DAY, 2011; NAGILL, KAUR, 2011; FIDALGO, GILLE, 2011; DUTCHIE *et al.*, 2012).

As vacinas candidatas à prolifaxia humana são divididas por gerações:

- primeira geração - popularmente conhecida como "leishmanisação", foi desenvolvida em 1940 e foi utilizada em vários países. Atualmente, o seu uso é limitado ao Uzbequistão. A sua utilização foi interrompida devido à falta de segurança. Esta vacina é composta por parasitas vivos virulentos ou atenuados de *Leishmania major*, que eram inoculados na pele e, desta forma, induziam infecção leve com subsequente imunidade (NAGILL, KAUR, 2011; DUTCHIE *et al.*, 2012);

- segunda geração – são baseadas no uso de proteínas recombinantes ou sintéticas, geneticamente modificadas de *Leishmania* sp., bactérias recombinantes ou vírus carreadores do antígeno *Leishmania*. Muitas proteínas do parasita têm sido investigadas como candidatas a vacina, tais como: clones de células T, complexos de antígenos e bibliotecas de expressão com soro de animais e seres humanos infectados. Dentre os antígenos estudados podem-se destacar: glicoproteína 63 (gp63), glicoproteína de membrana 46 (gp46, também conhecida como M-2), ligante manose fucose (FML), receptores homólogos de *Leishmania* para ativação de quinase C, entre outros (DUTCHIE *et al.*, 2012; NAGILL, KAUR, 2011);

- terceira geração – consiste na injeção direta de DNA de plasmídeo, que pode promover a biossíntese de proteínas endógenas e resposta imunológica específica. As vacinas de DNA são de fácil produção e administração, estáveis e muito imunogênicas. Estas vacinas são capazes de estimular a imunidade humoral, resposta de células T CD4+ e CD8+ (NAGILL, KAUR, 2011).

Existem muitas pesquisas na busca de vacinas efetivas contra a leishmaniose, no entanto, estes agentes profiláticos têm apresentado resultados conflitantes com relação à eficácia e ao tipo de resposta imunológica produzida (NAGILL, KAUR, 2011).

1.2 Dendrímeros

O primeiro dendrímero sintetizado foi o dendrímero de polipropilenoimina (PPI), por Vögtle *et al.*, em 1978. Este estudo consistiu na síntese controlada das ramificações por meio de etapas repetidas de mono e diaminas com o foco central. No entanto, as dificuldades sintéticas resultaram na obtenção de compostos de baixas gerações. Em 1985, os grupos de pesquisa de Newkome e Tomalia sintetizaram dendrímeros de

gerações mais elevadas e estruturas bem definidas, surgindo o primeiro grupo de dendrímeros (NANJWADE *et al.*, 2009; MEDINA, EL-SAYED, 2009; CHENG *et al.*, 2011).

A palavra dendrímero vem do grego *dendron*, que significa “árvore” ou “ramos”, e meros, que significa “parte”. Os dendrímeros são novas arquiteturas moleculares que se assemelham a uma árvore, e são amplamente distribuídos na natureza (GAJBHIYE *el al.*, 2009; JESUS, 2003; FISHER, VÖGTLE, 1999; ESFAND, TOMALIA, 2001; KAMINSKAS *et al.*, 2012; BARRETT *et al.*, 2009; KHANDARE *et al.*, 2012).

Dendrímeros são polímeros sintéticos bem definidos, extremamente ordenados, versáteis, globulares, de tamanhos nanoméricos de 10 a 30 Å, com grande número de subgrupos funcionais reativos e espaços interiores protegidos, características que os tornam úteis em sistemas biológicos (BARRETT *et al.*, 2009; PILLAI, PANCHAGNULA, 2001; MONTANARI *et al.*, 1998; JAIN *et al.*, 2010; SHEN, SHI, 2010; KHANDARE *et al.*, 2012; SVENSON, 2009). Estes polímeros são estruturas altamente ramificadas, que se diferenciam dos polímeros normais devido às suas ramificações altamente regulares e simétricas (LIU, FRÉCHET, 1999) (Figura 23). Os dendrímeros diferem dos polímeros clássicos em quatro características: simetria, grau de ramificação, funcionalização terminal e monodispersão ou baixa polidispersão. Estas propriedades permitem a obtenção de estruturas controladas com uniformidade molecular, superfície multifuncional e massa molecular única, características interessantes para aplicação destes no planejamento de fármacos. Podem ser divididos em três partes: uma superfície com elevado número de sítios reativos, uma camada de ligações repetidas partindo do centro e o foco central polifuncional ou núcleo, que deve possuir, no mínimo, dois grupos funcionais que permitam ligação com as unidades monoméricas (NANJWADE *et al.*, 2009; MONTANARI *et al.*, 1998; KAMINSKAS *et al.*, 2012; MINTZE, GRINSTAFF *et al.*, 2011; BARRETT *et al.*, 2009; MEDINA, EL-SAYED, 2009; CHENG *et al.*, 2011; McNERNY, LEROUEIL, BAKER, 2010).

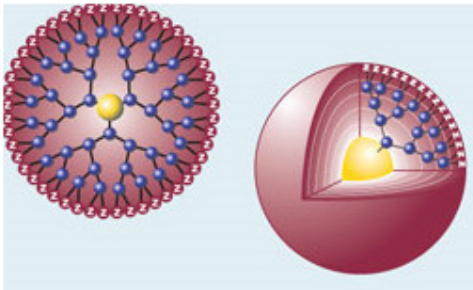


Figura 23: Representação esquemática de um dendrímero (PERKELL, 2004).

Até o momento, número expressivo de dendrímeros foi sintetizado e se encontra em estudo. Os compostos mais citados na literatura são dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), polilisina (PLL), poliamidas, poliésteres (PGLSA-OH) e polipropilenoimina (PPI). Alguns destes estão disponíveis comercialmente: PAMAM (Dendritech), poliamidas (Frontier Científica), PLL (Colcom) e PPI (DSM) (MINTZE, GRINSTAFF *et al.*, 2011; BARRETT *et al.*, 2009; JAIN *et al.*, 2010; ASTRUC, BOISSELIER, ORNELAS, 2010; KHANDARE *et al.*, 2012).

Estas moléculas crescem a partir de um núcleo (designado geração 0) e cada conjunto de unidades monoméricas adicionadas é designado por geração. Esta adição torna cada geração mais ramificada que a anterior até se obter estrutura globular e densa. Existem dendrímeros de geração 0 (G0) até a 10 (G10). No entanto, dendrímeros de gerações maiores podem apresentar defeitos nas ramificações, devido ao impedimento estérico entre os ramos. Estas estruturas podem apresentar várias disposições de tamanhos, formas, grupos químicos internos e de superfície, que permitem interação com fármacos (SEBESTIK, NIEDERHAFNER, JEKER, 2011; BARRETT *et al.*, 2009; JESUS, 2003; GRAYSON, FRÉCHET, 2001; McCARTHY *et al.*, 2005; MEDINA, EL-SAYED, 2009; NANJWADE *et al.*, 2009).

Estas estruturas podem alterar sua conformação mediante a ação da polaridade, força iônica, pH e solvente. Os dendrímeros, para serem empregados no desenvolvimento de fármacos e como seus transportadores, não devem ser tóxicos, imunogênicos (exceto para vacinas), devem ter a capacidade de atravessar barreiras fisiológicas, permanecer no organismo durante o tempo necessário para o efeito clínico e serem capazes de orientar as substâncias que irão transportar. Poucos estudos sobre a toxicidade de dendrímeros foram realizados. No entanto, alguns mostram que

dendrímeros de pequenas gerações (até a terceira) não possuem toxicidade significativa (BOAS, HEEGAARD, 2004; QIU, BAE, 2005; NANJWADE *et al.*, 2009; SEBESTIK, NIEDERHAFNER, JEKER, 2011; SVENSON, 2009).

A estrutura nanoscópica e a conformação adotada por estes compostos sugerem que dendrímeros de gerações mais elevadas podem mimetizar proteínas e são denominados por alguns pesquisadores como "proteínas artificiais". Entretanto, é importante considerar a diferença entre estas estruturas. As proteínas são polipeptídeos lineares, já a arquitetura ramificada do dendrímero, em grande parte, é composta por ligações covalentes, fazendo com que sejam menos flexíveis, adquirindo a forma globular devido às interações entre os grupos funcionais. Estudos demonstram que dendrímeros glicosilados são capazes de ter boa interação com receptores naturais de carboidratos, muitas vezes, permitindo a competição na ligação com estas substâncias naturais (BOAS, HEEGAARD, 2004; FARIN, AVNIR, 2001; REYMOND, DARBRE, 2012; NANJWADE *et al.*, 2009; McNERNY, LEROUEIL, BAKER, 2010).

1.2.1 *Aplicações*

Os dendrímeros têm sido utilizados em diversos segmentos, apresentando aplicações importantes nas áreas química, biológica, nanotecnológica, materiais, engenharia e eletrônica (JAIN *et al.*, 2010; SHEN, SHI, 2010; MEDINA, EL-SAYED, 2009; SEBESTIK, NIEDERHAFNER, JEKER, 2011).

Provavelmente, a área em que se têm registrado maiores desenvolvimentos no uso de dendrímeros é a área biológica. Isto se deve ao fato de que compostos considerados instáveis e/ou necessários em grande quantidade podem ser incorporados em estruturas maiores. Assim, os dendrímeros são estudados em transporte de fármacos; biotecnologia celular (proliferação celular); produtos oftalmológicos e ortopédicos; associação a peptídeos para mimetizar colágeno; terapia gênica e fotodinâmica; agentes de imagem para diagnóstico (Ressonância Magnética Nuclear, Raio-X, microscopia eletrônica e tomografia computadorizada) e radioimunoterapia (JESUS, 2003; LIU, FRÉCHET, 1999; EMANUELE, ATTWOOD, 2005).

A genética é uma área que vem se destacando na utilização dos dendrímeros como transportadores de macromoléculas para remoção de DNA de células e utilização posterior do complexo dendrímero-DNA para terapia gênica (JESUS, 2003).

1.2.1.1 *Dendrímeros no transporte de fármacos*

Os dendrímeros pertencem a um importante grupo de nanotransportadores, devido as suas características de baixa polidispersão, elevada funcionalidade e tamanho. Estes compostos podem melhorar as propriedades fisíco-químicas (solubilidade), farmacocinéticas (tempo de distribuição, liberação controlada e biodisponibilidade) e farmacodinâmicas de fármacos. Os dendrímeros são capazes de aumentar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, em razão das interações estabelecidas entre fármaco e dendrímero, como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações iônicas. Além disso, estes compostos podem proporcionar proteção ao fármaco contra degradação, maior estabilidade aos agentes bioativos, aumento da eficácia e redução da toxicidade (JAIN *et al.*, 2010; MEDINA, EL-SAYED, 2009; JESUS, 2003; LIU, FRÉCHET, 1999; EMANUELE, ATTWOOD, 2005; ASTRUC, BOISSELIER, ORNELAS, 2010).

Estas moléculas podem atuar como sistemas de transporte de fármacos de forma passiva, através da melhora das propriedades de permeabilidade e liberação prolongada do fármaco ou de forma ativa, por meio de sistemas de distribuição dirigidos ao local de ação, por exemplo, com o uso de grupos diretores para o alvo (KAMINSKAS *et al.*, 2012).

Para o uso destas moléculas no desenvolvimento e transporte de fármacos é importante levar em consideração a biopermeabilidade macroscópica, sendo que os dendrímeros de menores gerações apresentam maior permeabilidade e menor toxicidade (BOAS, HEEGAARD, 2004).

Os fármacos podem ser associados aos dendrímeros por (KAMINSKAS *et al.*, 2012; MINTZE, GRINSTAFF *et al.*, 2011; KAMINSKAS, BOYD, PORTER, 2011; BARRETT *et al.*, 2009; JAIN *et al.*, 2010; ASTRUC, BOISSELIER, ORNELAS, 2010; SEBESTIK, NIEDERHAFNER, JEKER, 2011; SVENSON, 2009; McNERNY,

LEROUEIL, BAKER, 2010; MEDINA, EL-SAYED, 2009; ASTRUC, BOISSELIER, ORNELAS, 2010):

- *encapsulação simples,* que consiste na interação física, com adsorção de moléculas pequenas no interior do dendrímero ou por interação com a malha dendrimérica, devido ao estabelecimento de interações hidrofóbicas, eletrostáticas ou ligações de hidrogênio. A encapsulação apresenta não só as vantagens de menor custo e tempo para obtenção, bem como menos exigências regulatórias para o preparo e liberação de compostos encapsulados, pois não são considerados como novas entidades químicas. Entretanto, o organismo pode liberar o fármaco ou eliminar este complexo mais rapidamente, o que acarreta necessidade de administração de doses mais elevadas para conseguir eficiente distribuição do composto bioativo. Exemplo desse tipo de dendrímero é o derivado de PAMAM, conjugado com fármacos anticancerígenos derivados de platina. Este dendrímero promove a liberação lenta da platina, proporcionando maior acúmulo em tumores sólidos e menor toxicidade em relação à cisplatina (BOAS, HEEGAARD, 2004).
- *ligação covalente* lábil do fármaco ao dendrímero, que seja hidrolisada em condições fisiológicas para a liberação do fármaco desejado. O agente ativo pode estar ligado covalentemente ao dendrímero por três vias: ligação direta do fármaco à superfície do dendrímero, por meio de molécula ligante (espaçante) ou quando o fármaco integra o transportador dendrimérico. Esta abordagem apresenta como vantagem a liberação controlada dos compostos ativos, ocorrendo, assim, a redução das concentrações a serem administradas ao paciente. No entanto, para obtenção destas moléculas são necessárias muitas etapas sintéticas, o que demanda maior tempo e custo para o seu preparo.

Giarolla e Ferreira, em 2008, solicitaram registro de patente de pró-fármacos dendriméricos constituídos por *mio*-inositol (foco central), agente espaçante (ácido málico) e o fármaco, sendo o núcleo e o espaçante moléculas capazes de participar em vias metabólicas celulares e/ou seus derivados farmaceuticamente aceitáveis, ou seja, não tóxicos ao organismo humano. O fármaco está ligado covalentemente ao espaçante, sendo os *dendrons* construídos com o fármaco, através de etapas seguidas de esterificação. A malha dendrimérica é composta pela substância ativa, permitindo

aumento exponencial do fármaco a cada geração do dendrímero (Figura 24). Assim, os pró-fármacos podem ser ativados no organismo, obtendo-se liberação controlada, redução da toxicidade, aumento de eficácia, além de melhoria nas características físico-químicas dos agentes bioativos.

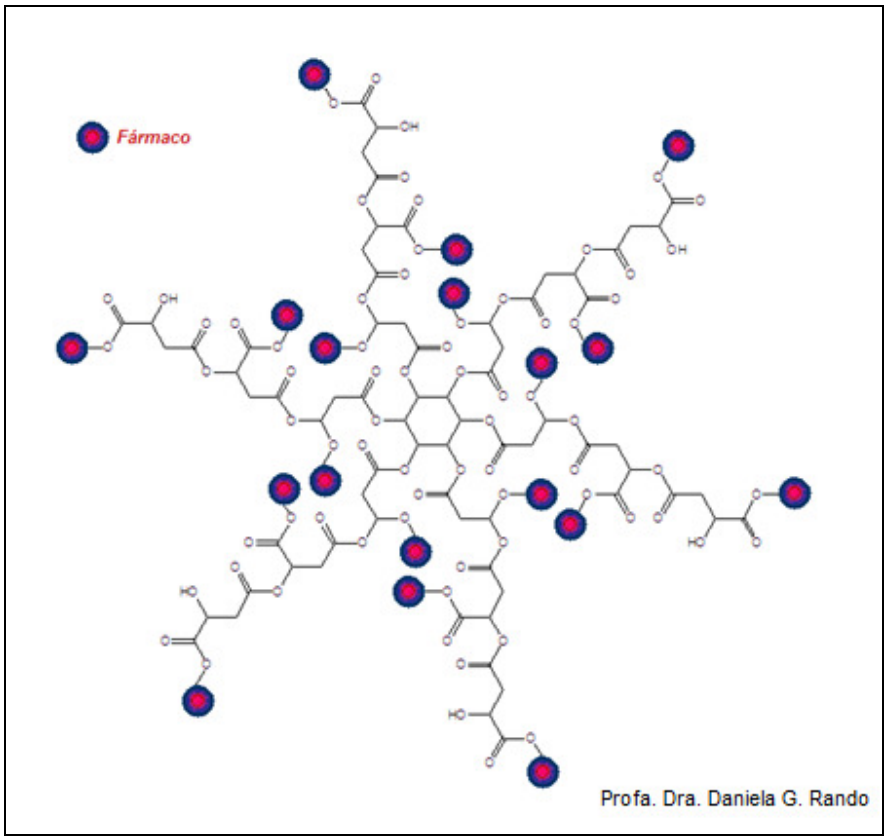


Figura 24: Representação esquemática do dendrímero de terceira geração, em que os fármacos compõem as *dendrons* (GIAROLLA, FERREIRA, 2008).

De acordo com sua constituição, os dendrímeros podem ser classificados em glicodendrímeros e peptidodendrímeros.

Glicodendrímeros são aqueles que contêm carboidratos em sua estrutura. O primeiro trabalho desenvolvido com glicodendrímeros foi publicado por Roy *et al.*, em 1993. Neste trabalho, o açúcar foi ligado ao ácido siálico para promover atividade inibitória contra o vírus da gripe, atuando na hemaglutinina que é um tipo de lectina que reconhece os sialosídeos nas vias respiratórias (SEBESTIK, NIEDERHAFNER, JEKER,

2011). Os glicodendrímeros vêm sendo amplamente utilizados para obtenção de sistemas mais seguros para o transporte de fármacos. Estes podem ser classificados em três categorias, de acordo com a localização do carboidrato na malha dendrimérica: dendrímeros funcionalizados com açúcar, carboidrato como foco central e ramificações constituídas por hidratos de carbono. Os carboidratos são associados à estrutura do dendrímero com o objetivo de melhorar a biocompatibilidade das estruturas dendríticas disponíveis (CHENG *et al.*, 2011). Além disso, estes compostos têm sido utilizados para o estudo da interação proteína-carboidrato (NANJWADE *et al.*, 2009).

Peptidodendrímeros são aqueles que contêm peptídeos na superfície ou incorporados nas ramificações. Estes polímeros desempenham relevante papel em diversas áreas biomédicas. Tais compostos combinam as propriedades de dendrímeros orgânicos, como multivalência, e características de peptídeos e proteínas, como catálise e suscetibilidade à degradação por proteases (REYMOND, DARBRE, 2012; NANJWADE *et al.*, 2009). Podem ser absorvidos pelas células, portanto, são importantes em sistemas de transporte de fármacos.

O primeiro produto farmacêutico dendrimérico disponível comercialmente foi a formulação intravaginal VivaGel® (Starpharma). Esta preparação é composta por dendrímero microbicida de polilisina, indicado para o tratamento de infecções herpéticas e HIV. Atualmente, existem muitos produtos em desenvolvimento nas áreas farmacêutica, médica, terapia gênica e de química fina (Tabela II) (GAJBHIYE *et al.*, 2009; ASTRUC, BOISSELIER, ORNELAS, 2010; McNERNY, LEROUEIL, BAKER, 2010; NANJWADE *et al.*, 2009).

Tabela II – Produtos em desenvolvimento que utilizam dendrímeros (NANJWADE *et al.*, 2009)

Produtos médicos e farmacêuticos com dendrímeros	**Prova de conceito**	**Líder**	**Ensaios clínicos**	**Mercado (terapêutica)**
VivaGel™	→	→	→	→
ADME Engineering™	→	→		
Diagnóstico *in vivo* e *in vitro*				
Stratus CS®	→	→	→	→
MRI imagem (detecção de câncer)	→	→		
Produtos para terapia gênica	**Prova de conceito**	**Protótipo**	**Pré-lançamento**	**Mercado (terapêutica)**
Reagente de terapia gênica Superfect®	→	→	→	→
Reagente de terapia gênica Priofect™	→	→	→	
Produtos de ciência de materiais	**Prova de conceito**	**Líder**	**Ensaios clínicos**	**Mercado (terapêutica)**
Priostar™ Dendrimers	→	→	→	→
Starbust™ Dendrimers	→	→	→	→

1.2.1.1.1 <u>Propriedades farmacocinéticas dos dendrímeros</u>

Na maioria dos estudos realizados com dendrímeros, como transportadores de fármacos, estas macromoléculas foram administradas por via parenteral (intravenosa, subcutânea ou intraperitoneal). Embora a administração parenteral tenha sido a mais utilizada, muitas evidências sugerem potencial absorção epitelial destes compostos, no intestino e na pele. Algumas pesquisas mostraram que os dendrímeros podem potencializar a permeabilidade intestinal de fármacos, quando estes foram administrados com este sistema de transporte (KAMINSKAS, BOYD, PORTER, 2011).

Apesar da extensa aplicabilidade no campo farmacêutico, o uso de dendrímeros com grupo amina terminal (PAMAM, PPI e PLL) em sistemas biológicos pode provocar

significativa toxicidade, devido aos grupos funcionais catiônicos de superfície. A toxicidade é atribuída à interação inespecífica da superfície catiônica dos dendrímeros com a carga negativa das membranas biológicas *in vivo*. Esta interação desencadeia ruptura da membrana, promovendo a liberação de enzimas citosólicas e morte celular. Além disso, podem ocorrer interações dos dendrímeros com ácidos nucléicos, o que provoca interferências no ciclo celular e na síntese protéica (JAIN *et al.*, 2010; SEBESTIK, NIEDERHAFNER, JEKER, 2011; CHENG *et al.*, 2011).

Estratégias para a redução da toxicidade dos dendrímeros envolvem o desenvolvimento de compostos menos tóxicos, com foco central biodegradável e unidades de repetição que possam ser convertidas em produtos metabólicos. Dendrímeros biodegradáveis estão sendo desenvolvidos para diminuir a toxicidade, dentre eles derivados de poliéster, poliéter e triazina. Os dendrímeros de poliésteres têm se destacado devido à biocompatibilidade e degradabilidade *in vitro* e *in vivo* (JAIN *et al.*, 2010; SEBESTIK, NIEDERHAFNER, JEKER, 2011; SVENSON, 2009; MEDINA, EL-SAYED, 2009).

Com relação à eliminação do organismo, Barrett *et al.*, em 2009 apresentaram resultados mostrando que os dendrímeros são predominantemente excretados pelos rins (KAMINSKAS, BOYD, PORTER, 2011).

1.2.2 *Síntese dos dendrímeros*

Os dendrímeros são preparados por meio de síntese repetitiva, que envolve o uso de núcleos polifuncionais, que acumulam unidades monoméricas repetitivas de modo radial exponencial, capaz de construir “braço-sobre-braço” até que topologia semelhante a uma árvore seja estabelecida. A síntese de dendrímeros representa procedimento “passo a passo”, muito bem controlado. A estratégia sintética repetitiva permite o controle do número de gerações, grupos funcionais, massa molecular e tamanho. As estruturas dendríticas podem ser sintetizadas quimicamente por dois métodos principais (Figura 25): convergente e divergente (MONTANARI *et al.*, 1998; TOMALIA *et al.*, 1985; KAMINSKAS *et al.*, 2012; MEDINA, EL-SAYED, 2009).

O *método convergente*, proposto por Hawker e Fréchet (1990), inicia com a síntese das ramificações e, posteriormente, estas são ligadas ao núcleo para a síntese

do dendrímero. O princípio básico do método envolve a construção de pequenas unidades fragmentadas, que são os *dendrons*. Esses *dendrons* são, então, unidos para a ligação ao núcleo central e, consequentemente, para a formação final do dendrímero (MONTANARI *et al.*, 1998; ESFAND, TOMALIA, 2001; MINTZE, GRINSTAFF *et al.*, 2011; BARRETT *et al.*, 2009; MEDINA, EL-SAYED, 2009; NANJWADE *et al.*, 2009).

Desenvolvido por Tomalia *et al.* (1985), Newkome *et al.* (1985) e Vöggtle *et al.* (1978), o *método divergente* envolve o crescimento de um foco central, em que as ramificações são ligadas gradualmente ao núcleo, por meio de etapas sintéticas repetitivas. Este método é caracterizado por reações que ocorrem por aumento do número de sítios, como se o dendrímero estivesse sendo construído "de dentro para fora", até se obter o derivado desejado (JESUS, 2003; ESFAND, TOMALIA, 2001; KAMINSKAS *et al.*, 2012). Neste método, o elevado número de reações que são realizadas em uma única molécula pode provocar mais imperfeições e falhas na estrutura (MONTANARI *et al.*, 1998; MINTZE, GRINSTAFF *et al.*, 2011; BARRETT *et al.*, 2009; SHEN, SHI, 2010; MEDINA, EL-SAYED, 2009; NANJWADE *et al.*, 2009).

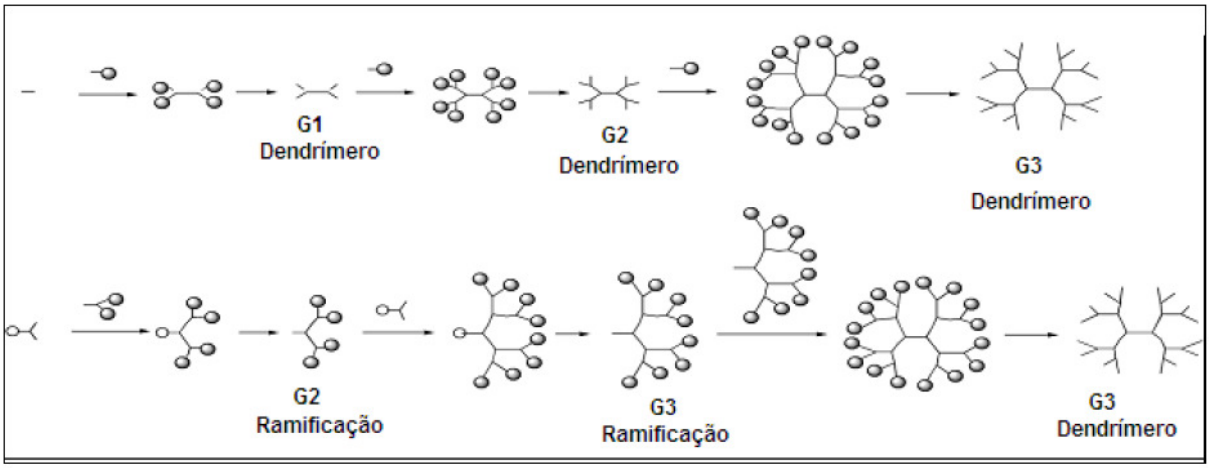


Figura 25: Síntese de dendrímeros pelo método divergente e convergente, respectivamente (BOAS, HEEGAARD, 2004).

Pode ocorrer problema na síntese divergente devido à reação incompleta dos grupos terminais, uma vez que estes defeitos estruturais se acumulam com a construção das gerações seguintes. Apresenta como vantagens a síntese rápida, o crescimento exponencial e proporciona obtenção de dendrímeros maiores. Na síntese

convergente, o segmento cresce a cada passo reacional e é acoplado posteriormente ao foco central. Desta forma, esta abordagem facilita a remoção de subprodutos e caracterização, além da obtenção de compostos finais mais monodispersos, com melhor controle da massa molecular. No entanto, o método convergente não permite a obtenção de tantas gerações como o divergente, devido ao impedimento estérico apresentado entre as ramificações (JESUS, 2003; KLAJNERT, BRYSZEWSKA, 2001; MEDINA, EL-SAYED, 2009; SEBESTIK, NIEDERHAFNER, JEKER, 2011; NANJWADE *et al.*, 2009).

Atualmente, outros métodos estão sendo relatados para a síntese de dendrímeros, tais como:

- crescimento exponencial duplo – método descrito por Kawaguchi *et al.* (1995), na síntese de dendrímeros de fenilacetileno. Esta abordagem utilizou monômeros fenílicos com três ramificações e um foco central triazina com duas proteções. Esta síntese utiliza as abordagens convergente e divergente. A proteção ou etapas de ativação são eliminadas pelo uso sequencial de dois diferentes blocos de construção em duas reações acopladas ortogonais. Este método apresenta as vantagens e desvantagens dos métodos divergente e convergente. Uma das principais desvantagens é o impedimento estérico, pois o dendrímero duplica de tamanho a cada nova geração, o que limita o número de gerações obtidas (MEDINA, EL-SAYED, 2009; NANJWADE *et al.*, 2009);

- **crescimento do foco e monômeros ramificados** – este método envolve pré-montagem de espécies monoméricas, em que o foco central cresce um pouco e, posteriormente, as ramificações são ligadas neste foco. Com esta abordagem obtiveram-se maiores rendimentos que o método convergente (NANJWADE *et al.*, 2009).

1.3 Modelagem molecular

A Química Farmacêutica estuda as origens moleculares da atividade biológica dos fármacos, determinando os parâmetros que relacionam estrutura com atividade e aplicando estes fundamentos no planejamento racional dos fármacos. Os receptores celulares são biomacromoléculas de extrema sensibilidade, responsáveis pelo

reconhecimento molecular de espécies endógenas e exógenas capazes de apresentar atividade biológica. Estes receptores interagem reversivelmente, em geral, com as moléculas bioativas (mediadores celulares endógenos e fármacos) (BARREIRO *et al.*, 1997; HENKEL, BILLINGS, 1995; EKINS *et al.*, 2007).

A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são ferramentas importantes para a descoberta e planejamento racional de novos fármacos (EKINS *et al.*, 2007; NADENDLA, 2004; SANT'ANNA, 2009).

Segundo a IUPAC, "modelagem molecular é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer a representação tridimensional".

O planejamento de fármacos auxiliado pelo computador (CADD, *Computer-Assisted Drug Design*) pode ser empregado para determinar distâncias interatômicas e densidades eletrônicas de moléculas de interesse biológico, estudar o equilíbrio conformacional das biomoléculas definindo as conformações potencialmente bioativas, explicar as atividades farmacológicas das substâncias, definir, confirmar ou descartar hipóteses para o mecanismo de ação ao nível eletrônico e molecular de diversos fármacos e, finalmente, identificar interações específicas entre fármacos e receptores, definindo os grupos farmacofóricos. É possível, ainda, definir hipóteses para sítios receptores de diversas classes de fármacos. Deste modo, podem-se planejar, com base racional, novos fármacos mais específicos e potentes, capazes de emprego terapêutico mais seguro (CARVALHO *et al.*, 2003; LIPKOWITZ, BOYD, 1990; BARREIRO *et al.*, 1997; CLARK, 1985; MA *et al.*, 2011; NADENDLA, 2004; STENTA, PERARO, 2011; MA *et al.*, 2011).

As moléculas construídas não estão, necessariamente, na conformação mais estável. Durante a construção de uma determinada estrutura, ocorrem distorções na molécula, com formação desfavorável de comprimentos de ângulos de ligações e ângulos diédricos. Átomos não ligados também interagem na mesma região do espaço e provocam repulsão estérica e eletrostática. Para corrigir estas distorções, a otimização geométrica das moléculas é realizada pelo processo de minimização de energia, a partir de modelos de aproximação clássica, que inclui os métodos de mecânica molecular e de dinâmica molecular, e a aproximação quântica, que inclui os

métodos *ab initio* e semiempíricos. De modo geral, a escolha entre estas aproximações depende das propriedades que se quer avaliar, da precisão desejada e da capacidade computacional disponível para a realização dos cálculos. Interações não previsíveis, relacionadas à sobreposição de orbital molecular, distribuição de densidade eletrônica ou interferências estéricas podem, também, ser solucionadas pelos métodos computacionais (CARVALHO *et al.*, 2003; STENTA, PERARO, 2011; SANT'ANNA, 2009).

O método de *mecânica molecular* baseia-se na visão clássica da estrutura molecular como um conjunto de esferas unidas por molas com constantes de força características. Neste caso, o campo de força é constituído pelo somatório de termos de energia relacionando as posições de equilíbrio do sistema (distância e ângulos de ligação, ângulos diedros, distâncias de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, entre outros) às quais podem ser associadas penalidades energéticas para seu afastamento. Este método permite o estudo de propriedades de grandes sistemas moleculares, além de ser mais rápido (BURKERT, ALLINGER, 1982; COHEN, 1996; STENTA, PERARO, 2011; NADENDLA, 2004). Atualmente, muitos campos de força estão disponíveis, diferindo, principalmente, quanto ao tipo de sistema mais adequado para serem usados e o número e tipo de funções de energia que compõem o campo. Alguns exemplos de campos de força são o MM (MM2 e versões posteriores) e AMBER, entre muitos outros (SANT'ANNA, 2009).

As simulações de *dinâmica molecular* podem ser empregadas com o objetivo de mimetizar os sistemas reais. A dinâmica molecular é o método de análise conformacional que simula evolução dos movimentos moleculares no tempo, chamada trajetória, que pode ser usada para o estudo de propriedades que dependem do tempo, tais como a difusão, o dobramento de cadeias moleculares (como acontece no enovelamento de proteínas) e a distribuição de moléculas de solvente ao redor de um soluto, entre outros. Em um cálculo de dinâmica molecular, as moléculas, que têm certa energia cinética, podem superar barreiras de energia potencial, o que permite a exploração da superfície de energia potencial na busca de outras conformações estáveis. O tempo da trajetória avaliada é, em geral, curto, visto que a simulação de dinâmica é um processo computacionalmente bastante oneroso. Para sistemas na faixa

dos milhares de átomos, a maior parte das simulações se restringe às centenas de picossegundos, a menos que computadores com elevada capacidade de processamento sejam utilizados. Para sistemas menores, a trajetória pode alcançar a faixa de nanossegundos (SANT'ANNA, 2009).

O método de *mecânica quântica* utiliza as equações da física quântica para calcular as propriedades das moléculas, a partir das interações entre os elétrons. Os cálculos da mecânica quântica não são exatos, pois são feitas algumas aproximações baseadas em dados empíricos, e podem ser subdivididos em dois métodos: *ab initio* e semiempírico. O método *ab initio,* apesar de ser mais preciso, consistente e não necessitar de dados armazenados, requer grande capacidade de memória e tempo de cálculo do computador. O método semiempírico é menos exato, porém mais rápido e pode ser utilizado na minimização de energia e otimização de moléculas que variam de 10 a 120 átomos (CARVALHO *et al.*, 2003; PATRICK, 2008; STENTA, PERARO, 2011; SANT'ANNA, 2009).

A abordagem que vem sendo mais comumente empregada é a combinação de métodos de mecânica quântica e mecânica molecular. Neste método, as regiões mais relevantes quimicamente são tratadas com mecânica quântica, enquanto outras porções são tratadas com mecânica molecular. Proposto em 1976 por Warshel e LeWitt, os métodos híbridos de MQ/MM têm sido empregados com sucesso na área biológica e de materiais. Esta abordagem proporciona melhor compreensão dos mecanismos de interação entre o fármaco e o receptor (STENTA, PERARO, 2011; NADENDLA, 2004).

1.4 Latenciação

Em 1899, a Schering® desenvolveu o primeiro pró-fármaco, a metenamina (ou hexamina), e no mesmo período a Bayer® introduziu o ácido acetisalicílico, forma menos irritante do ácido salicílico. Em 1935, a Bayer® lançou o pró-fármaco Prontosil, antibacteriano que libera a forma ativa *p*-aminofenilsulfonamida, após ativação de enzimas redutoras, mas este pró-fármaco não foi desenvolvido intencionalmente (HUTTUNEN, RAUNIO, RAUTIO, 2011).

Entretanto, apenas em 1958, o termo pró-fármaco ou pró-agente foi utilizado primeiramente por Albert, para descrever compostos que necessitavam de biotransformação prévia para promover efeito farmacológico. Em 1959, Harper propôs o termo latenciação de fármacos para o processo de obtenção de pró-fármacos (KOROLKOVAS, 1988; TESTA, KRÄMER, 2009; TESTA, 2009a; TESTA, 2009b; VERMA *et al.*, 2009).

No entanto, apenas em meados de 1970, os pesquisadores começaram a traçar os destinos dos fármacos no organismo, compreendendo os processos farmacocinéticos e a partir de então o planejamento de fármacos utilizando o processo de latenciação tomou rumo mais definido. Pró-fármacos são derivados química e farmacologicamente inativos da molécula matriz, que necessitam de ataque químico ou enzimático ou de ambos para serem convertidos no organismo no fármaco matriz, antes ou após alcançar o local de ação (Figura 26) (BUNDGAARD, 1985; CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; WERMUTH, 2008; ETTMAYER *et al.*, 2004; TESTA, CALDWELL, 1996; TESTA, 2004; TESTA, KRÄMER, 2009; HUTTUNEN, RAUNIO, RAUTIO, 2011; RAUTIO *et al.*, 2008; MÜLLER, 2009; TESTA, 2009b; VERMA *et al.*, 2009).

Pró-fármaco é uma abordagem viável para o aprimoramento de propriedades como: solubilidade, estabilidade química, organolépticas, biodisponibilidade, redução de pré-metabolização, liberação controlada e redução da toxicidade do fármaco matriz. Adicionalmente, os pró-fármacos têm sido utilizados para conferir seletividade ao fármaco para o local de ação (TESTA, KRÄMER, 2009; HUTTUNEN, RAUNIO, RAUTIO, 2011; SIMPLÍCIO, CLANCY, GILMER, 2008; STELLA, ADDAE, 2007; TESTA, 2009a; RAUTIO *et al.*, 2008; MÜLLER, 2009; TESTA, 2009b; VERMA *et al.*, 2009).

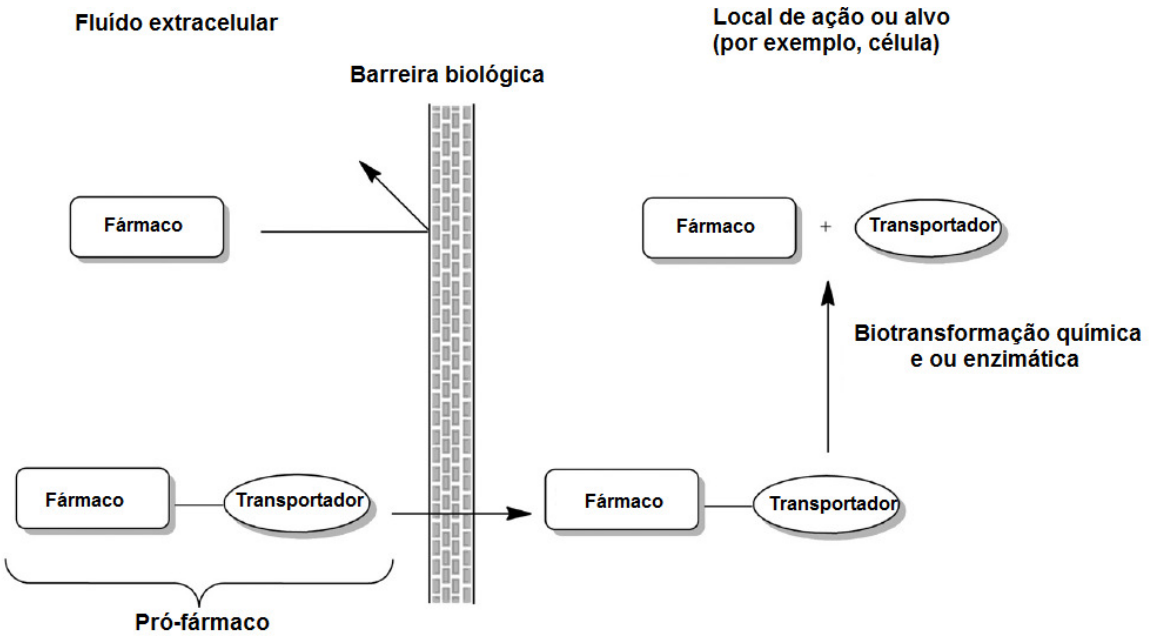


Figura 26: Representação esquemática sobre o conceito clássico de pró-fármaco (HUTTUNEN, RAUNIO, RAUTIO, 2011).

Alguns critérios são importantes e devem ser considerados durante o planejamento de pró-fármacos: existência de grupos funcionais na molécula matriz capazes de sofrer derivatização; existência de mecanismos e/ou sistemas no organismo humano capazes de bioativar o pró-fármaco; facilidade e simplicidade de sua síntese e purificação; estabilidade química; regeneração, *in vivo*, do composto bioativo em quantidades ideais e toxicidade menor que o composto bioativo de partida. Dessa forma, a latenciação permite atingir diversos objetivos, mediante a escolha de transportadores adequados que, via de regra, devem ser desprovidos de atividade biológica e, de preferência, biodegradáveis. Adicionalmente, não devem apresentar toxicidade ou antigenicidade intrínseca e não acumular no organismo. Condição essencial é a de que fármaco/composto ativo e transportador apresentem grupos funcionais para ligação química lábil (FRIIS, BUNDGAARD, 1996; CHUNG *et al.*, 2005; WERMUTH, 2008).

De acordo com Wermuth (1984), os fármacos latentes podem ser classificados em: pró-fármacos, subdivididos em pró-fármacos clássicos e bioprecursores, pró-fármacos recíprocos, pró-fármacos mistos e fármacos dirigidos.

Pró-fármacos clássicos são substâncias que envolvem a ligação do fármaco a um transportador, promovendo a melhoria da atividade terapêutica por meio de alterações farmacocinéticas, em geral, como biodisponibilidade. Proporcionam, também, a diminuição da toxicidade, prolongamento da ação, aumento da seletividade, mediante a escolha de transportador adequado (CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; TESTA, CALDWELL, 1996; TESTA, KRÄMER, 2009; VERMA *et al.*, 2009).

Bioprecursores, diferentemente dos pró-fármacos clássicos, não apresentam transportador. Constituem-se em moléculas resultantes de modificação molecular com a formação de um novo composto, sem transportador, que deve sofrer biotransformação *in situ* pelo sistema redox celular para transformar-se em metabólito ativo (CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; WERMUTH, 2008; TESTA, KRÄMER, 2009; RAUTIO *et al.*, 2008; TESTA, 2009b; VERMA *et al.*, 2009).

Pró-fármacos recíprocos são compostos em que o transportador e o fármaco/composto bioativo matriz apresentam atividade biológica, permitindo, assim, sinergismo de ação por dupla ou única atividade por mecanismos distintos (SINGH, SHARMA, 1994).

Pró-fármacos mistos são compostos que possuem, ao mesmo tempo, características de pró-fármacos clássicos e de bioprecursores. Constituem-se em moléculas biologicamente inertes, que requerem várias etapas para a sua conversão à forma ativa, prolongando a liberação do fármaco em um sítio ou órgão específico (CHUNG *et al.*, 2005; WERMUTH, 2008; BREWSTER, BODOR, 1994). Exemplo dessa classe é o sistema CDS (*Chemical Delivery System*) (BODOR, 1987; PROKAI, PROKAI-TATRAI, BODOR, 2000), em que o transportador deve ser bioativado anteriormente à liberação do composto bioativo.

Fármacos dirigidos compreendem formas de transporte de fármaco em que o transportador, normalmente macromoléculas, como polímeros, proteínas, hormônios, anticorpos, têm alta seletividade por receptores celulares e a biotransformação é mediada por enzimas (SCHACHT *et al.*, 2003; TAKAKURA, HASHIDA, 1995). Aumentam, assim, a seletividade pelo seu sítio de ação e diminuem a toxicidade. Estes seguem a definição clássica de latenciação, devendo sofrer hidrólise (química ou enzimática) para liberar a porção ativa (CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005;

WERMUTH, 2008). Normalmente, se associa grupo diretor a transportadores poliméricos, aos quais se ligam os fármacos ou compostos bioativos.

Além das vantagens já apresentadas, a latenciação permite, também, a economia de tempo e recursos no desenvolvimento de novos fármacos. Ademais, possibilitam a reintrodução de fármacos antes descartados por suas propriedades indesejáveis e o aprimoramento de novos fármacos antes que sejam lançados na terapêutica (CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; WERMUTH, 2008; TESTA, 2004; HUTTUNEN, RAUNIO, RAUTIO, 2011; STELLA, ADDAE, 2007).

Entre os diversos métodos de preparação de pró-fármacos, a esterificação é o mais empregado. Estima-se que represente cerca de 49% de todos os produtos deste tipo disponíveis no mercado, seguida da formação de amidas, imidas e carbamatos. Frequentemente, são utilizados para aumentar a lipofilicidade do fármaco, para mascarar grupos ácidos carboxílicos e fosfatos, permitindo a passagem destes compostos através das membranas. Uma vez no organismo, as ligações ésteres são hidrolisadas por esterases encontradas na corrente sanguínea, fígado e outros órgãos e tecidos (RAUTIO *et al.*, 2008; MÜLLER, 2009; TESTA, 2009b; VERMA *et al.*, 2009). A utilização de agente espaçante, grupo químico que estabelece ligação entre o fármaco e transportador, permite o acesso maior e melhor por parte da enzima (KOROLKOVAS, 1988; BUNDGAARD, 1985; FRIIS, BUNDGAARD, 1996).

A maioria dos pró-fármacos é ativada por hidrólise, como ocorre em 80% deles (TESTA, KRÄMER, 2009). As vias enzimáticas mais exploradas para bioconversão metabólica de pró-fármacos são reações hidrolíticas realizadas por esterases (peptidases, fosfatases e carboxilesterases) e citocromo P450 (HUTTUNEN, RAUNIO, RAUTIO, 2011; TESTA, 2009a; MÜLLER, 2009).

Exemplo de aplicação deste método com o objetivo de obter fármacos dirigidos a receptores manosídicos de macrófagos infectados com *Leishmania* é o de Carvalho e colaboradores (2003), que sintetizaram o carboximetildextrano-tiomanopiranosídeo-pirimetamina (CMD-P) e o succinildextrano-tiomanopiranosídeo-pirimetamina (SD-P). Ensaiados em cultura de macrófagos infectados, o mais ativo foi o CMD-P, que provocou inibição de 46,4%, na concentração de 200 μg/mL.

A latenciação vem sendo amplamente utilizada na terapêutica, tornando-se uma das principais ferramentas no planejamento de fármacos. Atualmente, observa-se aumento considerável no número de trabalhos desenvolvidos com pró-fármacos em patentes, publicados em periódicos, em estudos clínicos e até em medicamentos comercializados. Aproximadamente 10% de todos os medicamentos disponíveis no mercado farmacêutico são pró-fármacos. Em 2009, 15% dos 100 fármacos mais vendidos (*blockbusters*) de baixa massa molecular foram classificados como pró-fármacos. Entre 2000-2008, cerca de 20% de todos os fármacos de baixa massa molecular aprovados pelo FDA eram pró-fármacos. Em 2008, os pró-fármacos corresponderam a 33% dos fármacos aprovados pelo FDA. Exemplo bem sucedido de pró-fármaco do tipo bioprecursor, disponível na terapêutica, são os inibidores de bomba de prótons, omeprazol e análogos, que são bioativados pelas células parietais do estômago (HUTTUNEN, RAUNIO, RAUTIO, 2011; STELLA, ADDAE, 2007; RAUTIO *et al*., 2008; MÜLLER, 2009).

1.5 Importância da manose no desenvolvimento de fármacos dirigidos potencialmente leishmanicidas

1.5.1 *Glicoconjugados com manose*

Os protozoários do gênero *Leishmania* sintetizam muitos glicoconjugados ricos em manose, uma vez que estes são essenciais para a virulência e sobrevivência do parasita. Este monossacarídeo é importante para a biossíntese destes glicoconjugados. A manose é convertida em um complexo manose ativado, GDP-manose, produto da reação catalisada por diversas enzimas, incluindo manose-6-fosfato isomerase, fosfomanomutase e GDP-manose pirofosforilase. A supressão do gene que codifica GDP-manose pirofosforilase em *Leishmania* leva à perda total de virulência. As enzimas fosfomanomutase e GDP-manose pirofosforilase transformam manose-6-fosfato em GDP-manose, que atua como doador de manose na síntese de moléculas como lipofosfoglicano, proteofosfoglicano, glicoinositolfosfolipídios e *N*-glicanos. Estudos demonstraram que a mutação nas enzimas fosfomanomutase e GDP-manose pirofosforilase reduz a capacidade de infecção do parasita na forma promastigota em

camundongos ou a sobrevivência destes em macrófagos, sugerindo que essas proteínas são essenciais para a forma intracelular, amastigota. No entanto, essas enzimas não são essenciais para a sobrevivência das formas promastigotas (LACKOVIC *et al.*, 2010).

Estudos têm demonstrado a presença de manose em glicoproteínas de *Leishmania,* o que sugere que estas podem ser reconhecidas pelos receptores de manose (AKILOV *et al.*, 2007; CHAKRABORTY, CHAKRABORTY, BASU, 1998).

1.5.2 *Receptores de manose*

Os macrófagos são células de imunidade inata, responsáveis pela detecção, captura e digestão de parasitas. Muitos patógenos têm desenvolvido formas de utilizá-los para sua sobrevivência e proliferação. Dentre estes, incluem-se os parasitas do gênero *Leishmania*. Os macrófagos são as células do sistema imunológico, diretamente relacionadas com o ciclo evolutivo da leishmaniose, pois o parasita se desenvolve dentro destes (DUTCHIE *et al.*, 2012; REY, 2001; MAURER, DONDJI, STEBUT, 2009; ZHANG *et al.*, 2010).

Os mecanismos moleculares envolvidos na internalização de *Leishmania* são pouco compreendidos. Entretanto, sabe-se que a entrada da forma promastigota nos macrófagos envolve múltiplas interações entre o parasita-hospedeiro, como o reconhecimento de ligantes específicos na superfície do parasita por receptores de macrófagos. Estudos demonstram que receptores de manose, receptor de fibronectina, receptor Fc e receptores de complemento (CR1 e CR3) estão envolvidos neste processo (PAILA, SAHA, CHATTOPADHYAY, 2010).

Os macrófagos têm muitos receptores em sua superfície celular, como os receptores de manose, cujas funções compreendem a liberação de hidrolases extracelulares, de reconhecimento de glicoconjugados que contenham manose terminal presentes em membranas de patógenos (como parasita *Leishmania*), internalização de glicoproteínas do parasita e captura de antígenos. O receptor de manose pertence à superfamília de receptores da lectina tipo C, que inclui o receptor para fosfolipase A_2 tipo M ($mPLA_2R$), o DEC205 e o Endo-180. Os receptores desta família caracterizam-se

pela presença de múltiplos domínios transmembrana de lectina tipo C (ROSKAMP *et al.*, 2005; UENO *et al.*, 2009; GAZI, POMARES, 2009; BASU, SETT, DAS, 1991).

Estes receptores estão envolvidos na resposta imunológica inata pelo reconhecimento e fagocitose de vários microrganismos, como as micobactérias, *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii* e *Cryptococcus neoformans* (AKILOV *et al.*, 2007).

Os receptores de manose apresentam três domínios extracelulares responsáveis pelo reconhecimento de ligantes endógenos e exógenos: domínio rico em cisteína *N*-terminal, capaz de se ligar a açúcares, sendo independente de cálcio (TAYLOR *et al.*, 2005); domínio de fibronectina tipo II, envolvido no reconhecimento dos vários subtipos de colágeno (POMARES *et al.*, 2006) e o domínio denominado C-*type lectin like domains* (CTLD), o qual é dependente de cálcio e reconhece açúcares terminados em *D*-manose, *L*-fucose e *N*-acetilglicosamina (TAYLOR *et al.*, 2005). O domínio CTLD pode interagir, também, com ligantes de origem microbiana como a manose, encontrada na superfície de muitos microrganismos e considerada um receptor de reconhecimento padrão (POMARES *et al.*, 2006).

Atualmente, no desenvolvimento de vacinas, está sendo utilizada a técnica de dirigir a vacina seletivamente ao local de ação. Desta forma, é possível aumentar a captação de antígenos pelas células apresentadoras de antígeno, por meio de revestimento do mesmo com manose, aumentando a captação da vacina devido à ligação com os receptores específicos desse carboidrato, existentes na membrana dos macrófagos (JANEWAY *et al.*, 2000). Segundo Romero e Morilla (2008) lipossomas manosilados de pentamidina mostraram maior atividade leishmanicida que o fármaco livre para o tratamento de leishmaniose visceral, devido ao aumento da captação do fármaco pelos macrófagos. A aplicação desse grupo diretor é, portanto, promissora no planejamento de fármacos dirigidos potencialmente leishmanicidas, pois permite que o fármaco atinja o local de ação.

1.6 Importância do *mio*-inositol em dendrímeros potencialmente leishmanicidas

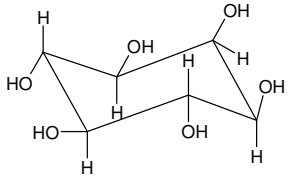


Figura 27: Estrutura do *mio*-inositol.

O *mio*-inositol (Figura 27) é um poliálcool cíclico contendo um anel de seis átomos de carbono e seis grupos OH (cicloexanopoliol). Trata-se de importante constituinte celular, envolvido em diferentes processos bioquímicos. Em mamíferos, o inositol existe principalmente sob a forma de derivados fosforilados, os quais participam da comunicação celular (ALMEIDA *et al.*, 2003).

É um componente essencial para o desenvolvimento celular de mamíferos e outros organismos vivos, entre eles, protozoários patogênicos como *Leishmania* ssp. Fosfolipídios são moléculas essenciais para a integridade da membrana e sinalização intracelular. A importância deste poliálcool cíclico está em sua participação como precursor biossintético de constituintes da superfície celular de *Leishmania*. A presença de inositol livre é condição prévia essencial para biossíntese de fosfolipídios de inositol. Este derivado pode ser fosforilado ou glicosilado para originar novos glicoconjugados (fosfoinositídeos, glicosilfosfatidilinositol e glicoinositolfosfolipídios), que estão ancorados em proteínas como a gp-63 e atuam em muitas atividades de proteção do parasita contra as defesas do hospedeiro (DREW *et al.*, 1995; WEINHART *et al.*, 1991; McCONVILLE, FERGUSON**,** 1993; SEYFANG, LANDFEAR, 2000).

Os protozoários são capazes de adquirir inositol para proliferação. Existem dois mecanismos principais para aquisição de inositol: síntese de inositol a partir de glicose-6-fosfato com a catálise de enzimas que convertem glicose-6-fosfato nesse composto e o outro mecanismo é a obtenção a partir do hospedeiro, por meio de transportadores desse álcool cíclico. No parasita, o inositol é utilizado para sintetizar derivados fosfolipídicos, componentes estruturais da membrana e precursores de várias outras moléculas lipídicas importantes, que estão envolvidas na infectividade de *Leishmania* em macrófagos. Estudos indicam que o processo de infecção depende dos lipídios presentes na membrana, pois estes atuam na interação parasita-macrófago. No gênero

Leishmania, o inositol atravessa a membrana por transportador estruturalmente relacionado com os transportadores transmembranas específicos como o simporte *mio*-inositol H^+ (DREW *et al.*, 1995; PREVIATO *et al.*, 1992; REYNOLDS, 2009).

Os parasitas apresentam grande variedade de moléculas de glicosilfosfatidilinositol ancoradas em proteínas, não ligadas covalentemente. Estudos demonstram que 15% do total de fosfolipídios celulares das formas promastigotas do gênero *Leishmania* são constituídos por fosfolipídios de inositol. Na forma amastigota representam até 80% da superfície do parasita. Esta forma apresenta membrana resistente a detergentes. Foram identificados e caracterizados alguns fosfolipídios de inositol presentes no parasita: fosforilceramida de inositol, fosfato de fosfatidilinositol, difosfato de fosfatidilinositol e esfingofosfolipídios de inositol (KANESHIRO, JAYASIMHULU, LESTER, 1986; TACHADO, TABRIZI, SCHOFIELD, 1999; HSU *et al.*, 2007; SUTTERWALA *et al.*, 2008).

Os fosfolipídios de inositol apresentam papel crucial na membrana formando pontes lipídicas importantes para reconhecimento, regulação, crescimento, virulência, diferenciação celular, sinalização intracelular e modulação da resposta imunológica. Estes lipídios estão envolvidos durante os estágios de vida do gênero *Leishmania,* sobrevivência (no vetor e no hospedeiro), patogênese e, também, na invasão do parasita aos macrófagos (SUTTERWALA *et al.*, 2007; McCONVILLE, FERGUSON**,** 1993; DREW *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2003).

Encontraram-se proteínas com glicofosfatidilinositol ancoradas em diversos parasitas, incluindo *T. brucei*, *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*. Assim sendo, o inositol pode ser um grupo diretor importante para o planejamento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose (YAO, 2010; SMITH *et al.*, 1997).

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

No Brasil e em outros países do mundo a leishmaniose é um problema de saúde pública (SOUZA *et al.*, 2010; AMORA *et al.*, 2009; PAILA, SAHA, CHATTOPADHYAY, 2010). As perspectivas para o combate desta enfermidade estão relacionadas ao controle do vetor para evitar a transmissão desta infecção e na busca por agentes terapêuticos efetivamente eficazes para o tratamento desta doença (PITALUGA *et al.*, 2009).

Diante do apresentado, é extremamente necessário estender os estudos de planejamento de fármacos para doenças consideradas neglicenciadas, como as endemias tropicais, entre elas a leishmaniose, com vistas à descoberta de quimioterápicos mais eficazes que os atualmente disponíveis. Tais doenças, por afetarem populações de países pobres, sem recursos para a aquisição de medicamentos dessa natureza, não despertam interesse por parte do segmento industrial, especialmente, as indústrias multinacionais, o que dificulta a descoberta de novos fármacos, devido à falta de incentivo econômico e compromisso de investimento na pesquisa e desenvolvimento destes agentes terapêuticos (CHUNG *et al.*, 2005; BOER *et al.*, 2011; TIUMAN *et al.*, 2011).

Considerando-se a carência de fármacos leishmanicidas realmente eficazes e seguros para o tratamento desta patologia é premente a busca por novas alternativas quimioterápicas. Portanto, cabe aos pesquisadores dos países que sofrem com esta problemática dirigir esforços com vistas a esse objetivo.

Muitos agentes terapêuticos apresentam propriedades antiparasitárias que surpreendem quanto à eficácia e à seletividade. No entanto, revelam problemas quanto às propriedades físico-químicas, como baixa solubilidade, dificultando a ação destes compostos por não atingirem o local de ação, no caso da leishmaniose, o macrófago, célula em que há o desenvolvimento do parasita. Para obter maior seletividade, uma das possibilidades é o emprego da latenciação (CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; WERMUTH, 2008), que permite o planejamento de fármacos dirigidos eficientes, de alta seletividade. Tendo em vista a importância e as vantagens dos dendrímeros, estes podem ser utilizados como sistemas de transporte, possibilitando além do

aprimoramento da atividade destas substâncias, a seletividade, desde que ligados a grupos diretores da ação (JAIN *et al.*, 2010; MEDINA, EL-SAYED, 2009; JESUS, 2003; LIU, FRÉCHET, 1999; EMANUELE, ATTWOOD, 2005; ASTRUC, BOISSELIER, ORNELAS, 2010).

Diante do exposto e considerando-se a atividade potencial do hidroximetilnitrofural (CHUNG *et al.*, 2003) como leishmanicida (SANTOS *et al.*, 2010) e o pedido de patente (FERREIRA, GIAROLLA, 2008), fruto da aplicação desses transportadores para compostos bioativos, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração do hidroximetilnitrofural.

Assim, pretendeu-se a obtenção de :

1. fármaco dendrimérico dirigido do hidroximetilnitrofural, de primeira geração, com ação seletiva nos macrófagos, devido à presença de manose na estrutura;

2. fármaco dendrimérico dirigido do hidroximetilnitrofural, de primeira geração, com ação seletiva no parasita, devido à presença de inositol em sua estrutura, além deste constituir o foco central do dendrimérico planejado.

Os dendrímeros seriam compostos pelo inositol, como foco central da estrutura, e as ramificações construídas com o hidroximetilnitrofural (composto com atividade) e os grupos diretores (manose e inositol) (GIAROLLA, 2007).

A estrutura final do fármaco dirigido de hidroximetilnitrofural com manose proposto neste trabalho é apresentada na Figura 28.

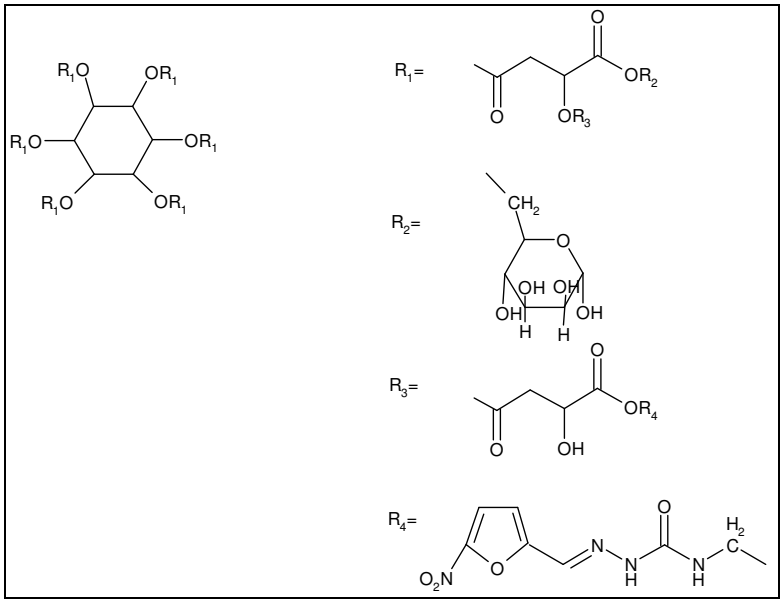


Figura 28: Estrutura proposta para o fármaco dirigido de hidroximetilnitrofural com manose.

O fármaco dirigido de hidroximetilnitrofural com inositol, proposto neste trabalho, é apresentado na Figura 29.

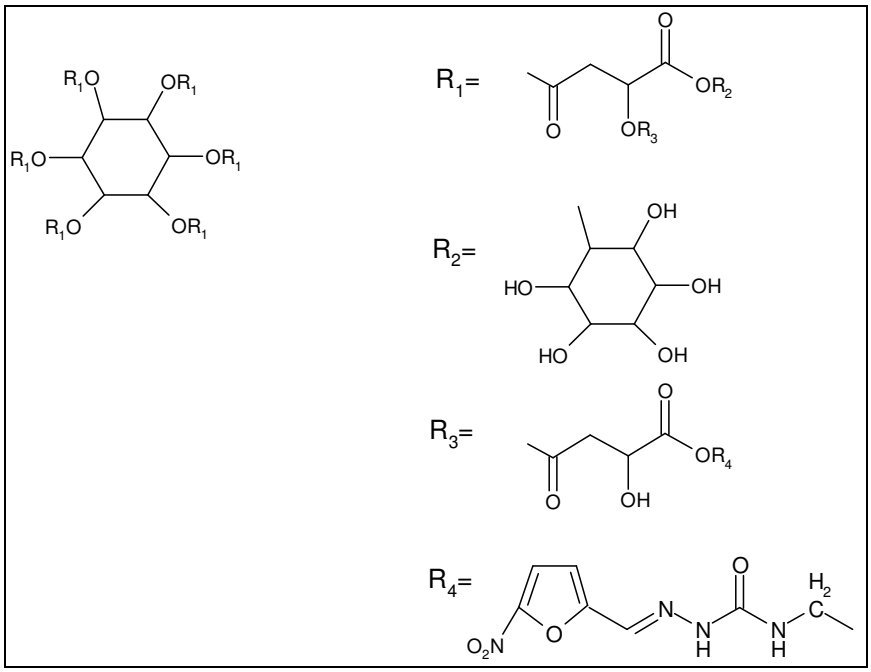


Figura 29: Estrutura proposta para o fármaco dirigido de hidroximetilnitrofural com *mio*-inositol.

A modelagem molecular foi aplicada para predição da liberação dos compostos ativos a partir do fármaco dirigido proposto, a exemplo do trabalho realizado por Giarolla *et al.* (2010, 2012).

O mecanismo de liberação sugerido para o derivado, após a respectiva interação e internalização no macrófago e/ou diretamente no parasita, compreenderá: a hidrólise dos ésteres diretamente ligados ao inositol, com hidrólise posterior do composto ativo (hidroximetinitrofural) e do transportador maleílico, ou a hidrólise inicial das ramificações mais externas, até que os *dendrons* ligados diretamente ao centro (inositol) sejam liberados.

MATERIAL E MÉTODOS

Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez.

Jean Cocteau

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 (4-NFC);
- acetato de etila;
- ácido acético glacial;
- ácido clorídrico;
- ácido L(-)-málico;
- ácido *p*-toluenossulfônico;
- ácido sulfúrico;
- água deuterada;
- álcool metílico;
- bicarbonato de sódio;
- carbonato de potássio;
- cloreto de benzoíla;
- cloreto de oxalila;
- cloreto de sódio;
- cloreto de tionila;
- cloroformato de etila;
- cloroformato de metila;
- clorofórmio;
- clorofórmio deuterado;
- *D*-manose;
- dicicloexilcarbodiimida (DCC);
- diclorometano (DCM);

- dimetilformamida (DMF);
- dimetilsulfóxido deuterado(DMSO);
- dioxano;
- éter dietílico;
- formaldeído 37%;
- hexano;
- hidróxido de sódio;
- *mio*-inositol;
- *N'*,*N*-carbonildiimidazol (CDI);
- *N*-metilmorfolina;
- nitrofural;
- sulfato de sódio anidro;
- tetracloreto de carbono;
- tetraidrofurano (THF);
- trietilamina.

3.1.2 *Equipamentos*

- espectrofotômetro FTIRBomem MB100;
- espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker 300 MHz, modelo *Advanced* DPX-300;
- liofilizador Christ Mod. Alpha 1-2;
- rotaevaporador Büchi;
- sintetizador paralelo Büchi.

3.1.3 *Softwares para modelagem molecular*

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

3.2 Métodos

3.2.1 *Síntese*

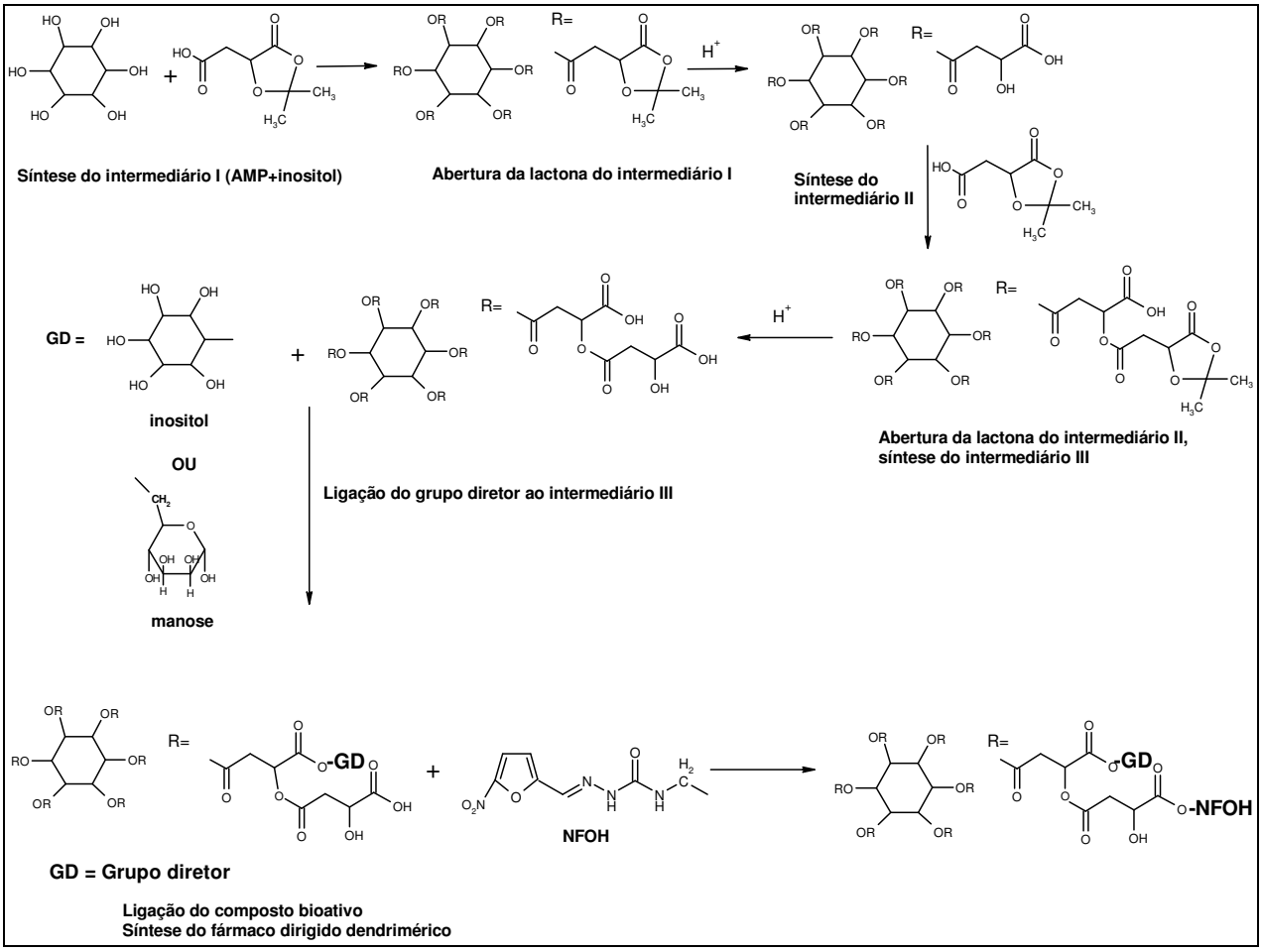


Figura 30: Esquema geral sintético proposto.

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

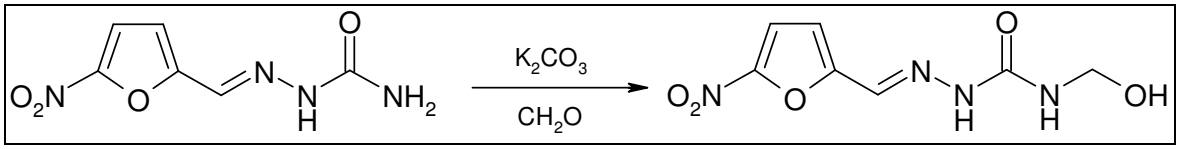


Figura 31: Síntese do derivado hidroximetilnitrofural (TROSSINI *et al.*, 2010b).

A síntese do derivado hidroximetilnitrofural foi realizada em meio alcalino. Nitrofural (5,00 mmol), carbonato de potássio (7,50 mmol) e água (10 mL) foram adicionados ao meio reacional. Formaldeído (18 mL) foi colocado em duas etapas, 9 mL no início da reação e 9 mL na metade do tempo total de síntese, ou seja, três horas e trinta minutos. Manteve-se o meio reacional em agitação constante com proteção da luz, por 7 horas. O experimento foi acompanhado por CCD, utilizando como fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético (85:10:5). O produto foi lavado com metanol e recristalizado de metanol/água (6:0,1 v/v).

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

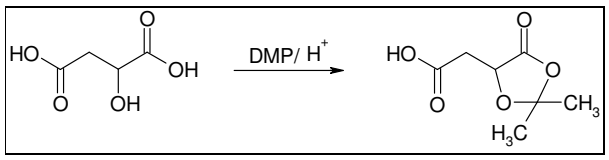


Figura 32: Síntese do ácido málico protegido (GIAROLLA, 2007).

Sob agitação e à temperatura ambiente foram mantidos o ácido L(-)-málico (7,50 mmol), ácido *p*-toluenossulfônico (0,16 mmol) e 2,2-dimetoxipropano (20,33 mmol), respectivamente. Após 30 minutos à temperatura ambiente, o material foi extraído em sistema água e diclorometano. Foi extraída mais duas vezes a fase aquosa com diclorometano. As fases orgânicas foram reunidas e secadas sob agitação magnética com sulfato de sódio anidro. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 50ºC. O

sólido obtido foi recristalizado de clorofórmio/tetracloreto de carbono 1:1 (v/v.), obtendo-se o ácido málico protegido.

3.2.1.3*Síntese dos fármacos dendriméricos dirigidos – método divergente*

3.2.1.3.1Síntese do intermediário I

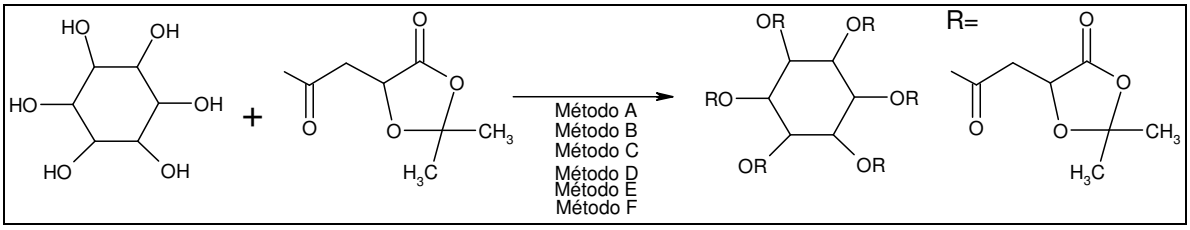


Figura 33: Síntese do intermediário I.

❖ Método A - dicicloexilcarbodiimida (DCC) como agente condensante

Em banho de gelo, mantiveram-se sob agitação ácido málico protegido e DCC, em solvente adequado (Tabela III). Após 30 minutos, o banho de gelo foi retirado e adicionaram-se DMAP e *mio*-inositol, com exceção do experimento A5, que não utiliza DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente conforme as condições reacionais descritas na Tabela III. Após este período, adicionou-se o solvente adequado e filtrou-se o conteúdo reacional (Tabela III). O filtrado foi extraído como relatado na Tabela III. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 50 ºC.

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

Tabela III – Condições reacionais e tratamento realizados nos experimentos A1, A2, A3, A4 e A5

Experimento	Reagentes/ solvente	mmol/ volume (mL)	Condições reacionais (horas)	Tratamento da reação	Referência
A1	- AMP - DCC - inositol - DMAP - THF	5,75 5,75 0,96 0,58 30	24	Éter etílico 30 mL Filtração	Adaptado de DAMEN *et al.*, 2000; GIAROLLA, FERREIRA, 2008.
A2	- AMP - DCC - inositol - DMAP - DCM	2,06 2,06 2,06 2,06 80	17	DCM 50 mL Condições de extração: Água - 125 mL – 2 vezes NaCl* – 125 mL – 1 vez	Adaptado de SHASTINA *et al.*, 2003.
A3	- AMP - DCC - inositol - DMAP - THF	2,87 7,10 2,87 2,87 12	4	acetato de etila 20 mL Condições de extração: $NAHCO_3$* - 20 mL – 2 vezes NaCl* – 20 mL – 1 vez	Adaptado de MORIZAKI, OSAKI,1996.
A4	- AMP - DCC - inositol - DMAP - Dioxano	2,87 2,87 2,87 2,87 15	15	acetato de etila 20 mL Condições de extração: $NAHCO_3$* - 20 mL – 2 vezes NaCl* – 20 mL – 1 vez	Adaptado de MORIZAKI, OSAKI,1996.
A5	- AMP - DCC - inositol - THF	2,87 2,87 4,35 30	26	acetato de etila 50 mL Condições de extração: $NAHCO_3$* - 50 mL – 2 vezes NaCl* – 50 mL – 2 vezes	Adaptado de DELONG, MCFADDEN, 2007.

* Solução saturada

❖ Método B - 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) como agente condensante

Em banho de gelo, mantiveram-se, por 30 minutos, sob agitação em solvente adequado, ácido málico protegido e EDC (Tabela IV). Em seguida, adicionaram-se *mio*-inositol e DMAP. A mistura reacional foi mantida sob agitação, conforme as condições reacionais discriminadas na Tabela IV. Ao término da reação, o produto foi extraído de acordo com as descrições da Tabela IV. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 50 ºC.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel hexano/acetato de etila2:1 (v/v).

Tabela IV – Condições reacionais e tratamento realizados nos experimentos B1, B2, B3, e B4

Experimento	Reagentes/ solvente	mmol/ volume (mL)	Condições reacionais	Tratamento da reação	Referência
B1	- AMP - EDC - inositol - DMAP - THF	5,75 5,75 0,96 0,57 30	24 h / T.A.	Acetato de etila - 50 mL Condições de extração: $NAHCO_3$* - 50 mL – 1 vez Água – 50 mL – 1 vez NaCl* – 50 mL – 1 vez	Adaptado de GOLDBERG, GHANDEHARI, SWAAN, 2010.
B2	- AMP - EDC - inositol - DMAP - THF	5,75 5,75 0,96 0,57 30	48 h / T.A.	Acetato de etila - 50 mL Condições de extração: $NAHCO_3$* - 50 mL – 1 vez Água – 50 mL – 1 vez NaCl* – 50 mL – 1 vez	Adaptado de GOLDBERG, GHANDEHARI, SWAAN, 2010.
B3	- AMP - EDC - inositol - DMAP - DCM	2,87 2,87 0,96 0,57 20	46 h / T.A.	DCM - 30 mL Condições de extração: $NAHCO_3$* - 20 mL – 3 vezes Água – 20 mL – 3 vezes	Adaptado de CHUNG *et al.*, 2011.

Tabela IV – Condições reacionais e tratamento realizados nos experimentos B1, B2, B3, e B4 (cont.)

Experimento	Reagentes/ solvente	mmol/ volume (mL)	Condições reacionais	Tratamento da reação	Referência
B4	- AMP - EDC - inositol - DMAP - DMF	2,87 2,87 0,96 0,90 10	51 h / 70 ºC	Acetato de etila - 20 mL Condições de extração: Água – 50 mL – 3 vezes $NAHCO_3$* - 50 mL – 3 vezes	Adaptado de CHUNG *et al.*, 2011.

* Solução saturada
T.A.: Temperatura ambiente

❖ Método C – método do anidrido misto (adaptado de VARGAS, 2007)

Em banho de gelo e sob atmosfera de argônio, adicionaram-se catalisador e ácido málico protegido em solvente adequado (Tabela V). Agitou-se por 15 minutos, adicionando-se, então, o respectivo cloroformato (Tabela V). Manteve-se a agitação por mais 30 minutos e adicionou-se *mio*-inositol. A reação foi mantida sob agitação e banho de gelo por mais uma hora. Posteriormente, manteve-se o meio reacional sob agitação em temperatura adequada, conforme descrito na Tabela V. Ao final, tratou-se a reação como descrito na Tabela V. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 50 ºC.

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

Tabela V – Condições reacionais e tratamento realizados nos experimentos C1, C2, C3, C4, C5 e C6

Experimento	Reagentes/ solvente	mmol/ volume (mL)	Condições reacionais	Tratamento da reação	Referência
C1	- AMP - cloroformato de etila - inositol - *N*-metilmorfolina - THF	1,00 1,00 0,17 1,00 20	24 h / T.A.	Acetato de etila - 50 mL Condições de extração: NaOH 1 M - 10 mL – 2 vezes NaCl* – 10 mL – 1 vez HCl 1M - 10 mL – 2 vezes NaCl* –10 mL – 1 vez	Adaptado de VARGAS, 2007.
C2	- AMP - cloroformato de etila - inositol - *N*-metilmorfolina - THF	1,00 1,00 1,00 1,00 20	24 h / T.A.	Acetato de etila - 50 mL Condições de extração: NaOH 1 M - 10 mL – 2 vezes NaCl* – 10 mL – 1 vez HCl 1M - 10 mL – 2 vezes NaCl* –10 mL – 1 vez	Adaptado de VARGAS, 2007.
C3	- AMP - cloroformato de etila - inositol - *N*-metilmorfolina - THF	1,00 1,00 1,00 1,00 20	96 h / T.A.	Acetato de etila - 50 mL Condições de extração: NaOH 1 M - 10 mL – 2 vezes NaCl* – 10 mL – 1 vez HCl 1M - 10 mL – 2 vezes NaCl* –10 mL – 1 vez	Adaptado de VARGAS, 2007.
C4	- AMP - 4-NFC - inositol - *N*-metilmorfolina - THF	8,62 8,90 1,44 8,90 50	24 h / T.A.	DCM - 50 mL Condições de extração: NaOH 1 M - 10 mL – 2 vezes NaCl* – 10 mL – 1 vez HCl 1M - 10 mL – 2 vezes NaCl* –10 mL – 1 vez	Adaptado de VARGAS, 2007.

Tabela V – Condições reacionais e tratamento realizados nos experimentos C1, C2, C3, C4, C5 e C6 (cont.)

Experimento	Reagentes/ solvente	mmol/ volume (mL)	Tempo e temperatura de reação	Tratamento da reação	Referência
C5	- AMP - cloroformato de etila - inositol - trietilamina - DCM	1,00 1,00 0,17 1,00 20	6 h / T.A.	Solvente removido sob pressão reduzida.	Adaptado de KAKWANI *et al.*, 2011.
C6	- AMP - cloroformato de metila - inositol - *N*-metilmorfolina - THF	1,00 1,00 1,00 1,00 20	26 h / 75 ºC	Acetato de etila - 40 mL Condições de extração: Água – 40 mL – 3 vezes	Adaptado de KAKWANI *et al.*, 2011.

* Solução saturada
T.A.: Temperatura ambiente

❖ Método D - *N*',*N*´-carbonildiimidazol (CDI) como agente condensante

Sob atmosfera de argônio e agitação, adicionou-se ácido málico protegido e CDI em solvente adequado anidro, conforme descrito na Tabela VI. Após o tempo de ativação, juntaram-se *mio*-inositol e outros reagentes (de acordo com o experimento) (Tabela VI). A mistura reacional foi mantida sob agitação em atmosfera inerte, de acordo com as condições reacionais relatadas na Tabela VI. Ao término da reação, o produto foi extraído de acordo com as descrições da Tabela VI. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 50 ºC.

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

Tabela VI – Condições reacionais e tratamento realizados nos experimentos D1, D2, D3 e D4

Experimento	Reagentes/ solvente	mmol/ volume (mL)	Condições reacionais	Condições de extração	Referência
D1	- AMP - CDI - inositol - DMAP - THF	5,75 5,75 0,96 0,57 30	Ativ.*[1]: 30 min. Tempo: 24 h T.A.	Acetato de etila - 50 mL Condições de extração: $NAHCO_3$* - 50 mL – 1 vez Água – 50 mL – 1 vez NaCl* – 50 mL – 1 vez	Adaptado de ABOUSSAFY *et al.*, 2010.
D2	- AMP - CDI - inositol - DMF	2,87 3,01 2,87 25	Ativ.*[1]: 10 min. Tempo: 3 h 70 ºC	Éter etílico - 50 mL Condições de extração: NaCl* – 50 mL – 2 vezes Água - 50 mL – 2 vezes	Adaptado de BODE *et al.*, 2010.
D3	- AMP - CDI - inositol - DMF	5,75 5,75 5,75 30	Ativ.*[1]: 8 h Tempo: 24 h 80 ºC	Acetato de etila - 30 mL Condições de extração: $NAHCO_3$* - 50 mL – 1 vez NaCl* – 50 mL – 1 vez Água – 50 mL – 1 vez	Adaptado de HUSSAIN, LIEBERT, HEINZE, 2004.
D4	- AMP - CDI - inositol - DMF	5,75 8,69 14,38 30	Ativ.*[1]: 5 min. Tempo: 16 h T.A.	Acetato de etila - 30 mL Condições de extração: Água – 60 mL – 1 vez $NAHCO_3$* - 60 mL – 1 vez NaCl* – 60 mL – 1 vez	Adaptado de TUKULULA, 2009.

* Solução saturada
*[1]Ativ.: tempo de ativação entre AMP e CDI.
T.A.: Temperatura ambiente.

⇒ Experimento D5 (adaptado de JONG *et al.*, 2001)

Sob atmosfera de argônio e agitação, adicionou-se ácido málico protegido (5,75 mmol) dissolvido em 10 mL de DMF anidro à solução de CDI (11,48 mmol) em 60 mL de DMF anidro. O meio reacional foi mantido sob agitação por 4 horas à temperatura ambiente. Após este período, adicionaram-se ao meio reacional 120 mL de

diclorometano. O conteúdo reacional foi extraído com 60 mL de água. A fase aquosa foi extraída mais duas vezes com diclorometano. As fases orgânicas foram unidas e secadas sob sulfato de sódio anidro, filtradas e o solvente foi removido sob pressão reduzida a 50 ºC.

O produto obtido na etapa anterior foi dissolvido em 100 mL de DMF anidro e foram adicionados *mio*-inositol (8,63 mmol) e DMAP (18,33 mmol). O meio reacional foi mantido sob agitação, à temperatura ambiente e atmosfera inerte, por 4 dias. Ao final, adicionaram-se 200 mL de diclorometano e lavou-se uma vez com solução aquosa de ácido clorídrico 1 M e três vezes com solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 50 ºC.

A reação foi acompanhada por CCD, com fase móvel hexano/acetato de etila2:1 (v/v).

- Método E – Esterificação de Fisher (adaptado de SANTOS, 2005)

Mantiveram-se sob agitação, ácido málico protegido e *mio*-inositol com solução aquosa de ácido sulfúrico 20% em solvente adequado, conforme as condições reacionais descritas na Tabela VII. Ao final, o conteúdo reacional foi extraído de acordo com as condições de extração relatadas na Tabela VII. A fase orgânica foi secada sob sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido sob pressão reduzida a 50 ºC.

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

Para o experimento E1 a porção aquosa obtida foi liofilizada.

Tabela VII – Condições reacionais e tratamento realizados nos experimentos E1 e E2

Experimento	Reagentes/ solvente	Concentração volume	Condições reacionais	Condições de extração
E1	- AMP - solução H_2SO_4 20% - inositol - THF	2,87 mmol 3 gts 2,87 mmol 15 mL	Tempo: 3 h T.A.	Acetato de etila - 20 mL Condições de extração: NaOH 1 M – 20 mL – 1 vez Água – 20 mL – 2 vezes
E2	- AMP - solução H_2SO_4 20% - inositol - DMF	5,75 mmol 5 gts 5,75 mmol 30 mL	Tempo: 27 h 70ºC	Acetato de etila - 30 mL Condições de extração: $NaHCO_3$* - 50 mL – 2 vezes Água - 50 mL – 2 vezes

* Solução saturada
T.A.: Temperatura ambiente.

❖ Método F - cloreto de acila para esterificação

Mantiveram-se, em banho de gelo e sob agitação, o ácido málico protegido e o respectivo cloreto de ácido em DMF anidro, conforme descrito na Tabela VIII. Após o tempo de ativação, juntaram-se *mio*-inositol e os outros reagentes (de acordo com o experimento). A mistura reacional foi mantida sob agitação, de acordo com as condições reacionais relatadas na Tabela VIII. Ao término da reação, o produto foi extraído conforme descrito na Tabela VIII. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, a 50 ºC.

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

Tabela VIII – Condições reacionais e tratamento realizados nos experimentos F1, F2 e F3

Experimento	Reagentes/ solvente	mmol/ volume (mL)	Condições reacionais	Condições de extração	Referência
F1	- AMP - cloreto de benzoíla - inositol - DMAP - TEA - DMF	5,75 5,75 0,48 2,87 11,48 50	Ativ.*: 30 min. Tempo: 24 h	Acetato de etila - 50 mL Condições de extração: Água – 100 mL – 3 vezes	Adaptado de DHIMITRUKA, SANTALUCIA, 2006.
F2	- AMP - cloreto de oxalila - inositol - TEA - DMF	2,87 2,87 0,48 5,75 25	Ativ.*: 10 min. Tempo: 24 h	Acetato de etila - 25 mL Condições de extração: HCl 1M - 50 mL – 2 vezes Água - 50 mL – 2 vezes	Adaptado de KOHL, THUNUS, LEJEUNE, 1997.
F3	- AMP - cloreto de tionila - inositol - TEA - DMF	5,75 2,87 0,48 5,75 50	Ativ.* 30 min. Tempo: 22 h	Acetato de etila - 50 mL Condições de extração: $NAHCO_3$* - 100 mL – 2 vezes Água – 100 mL – 2 vezes	Adaptado de HOSANGADI, DAVE, 1996.

3.2.1.3.2 <u>Síntese do malato de inositol</u> (DAMEN *et al.*, 2000; FERREIRA, GIAROLLA, 2008).

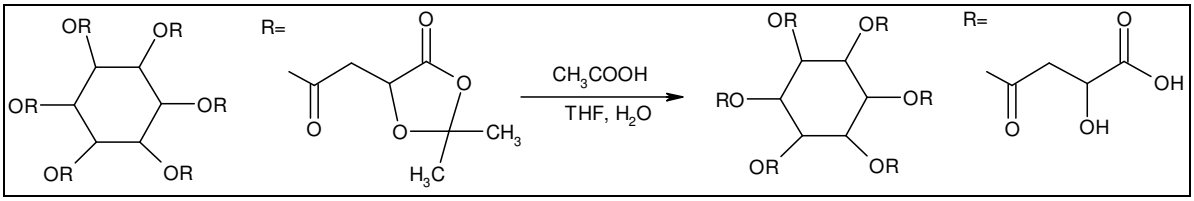


Figura 34: Hidrólise do intermediário I, síntese do malato de inositol (GIAROLLA, 2007).

Os compostos obtidos na etapa anterior com DCC e EDC foram dissolvidos em solução de ácido acético, tetraidrofurano e água (1:1:1, v/v/v). A mistura reacional foi

mantida sob agitação, à temperatura ambiente, por 24 horas. Posteriormente, os solventes foram removidos sob pressão reduzida a 50 ºC. Após a retirada do solvente, o produto foi lavado com água, acetato de etila e diclorometano, com 5 mL de cada solvente, e concentrado novamente sob pressão reduzida.

A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada, com fase móvel de clorofórmio/metanol 2:1 (v/v).

3.2.1.3.3 Síntese do intermediário II (adaptado de DAMEN *et al.*, 2000; FERREIRA, GIAROLLA, 2008).

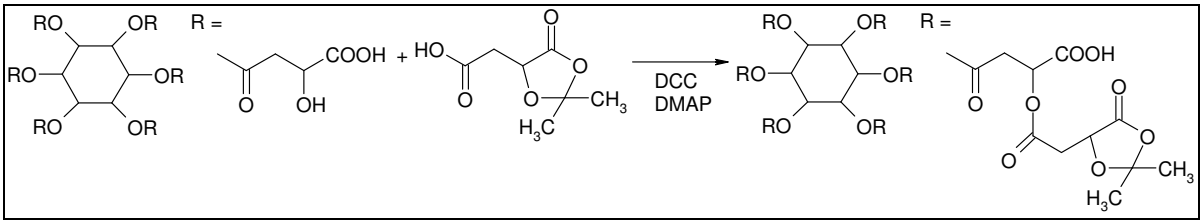


Figura 35: Síntese do intermediário II.

A partir do produto obtido na reação anterior, em banho de gelo e sob agitação, adicionaram-se 30 mL de THF, DCC (6:1), com relação ao intermediário obtido. Após 30 minutos, retirou-se o banho de gelo e foram adicionados ácido málico protegido na proporção de 1:6, e DMAP na proporção de 1:0,1, em relação ao malato de inositol. A mistura reacional foi submetida à agitação vigorosa por 24 horas. Após este período, adicionaram-se 30 mL de éter dietílico, sob agitação. Filtrou-se, o conteúdo reacional para remover o DCU. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 50 ºC.

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

3.2.1.3.4 Desproteção do intermediário II, obtenção do intermediário III (DAMEN *et al.*, 2000; FERREIRA, GIAROLLA, 2008).

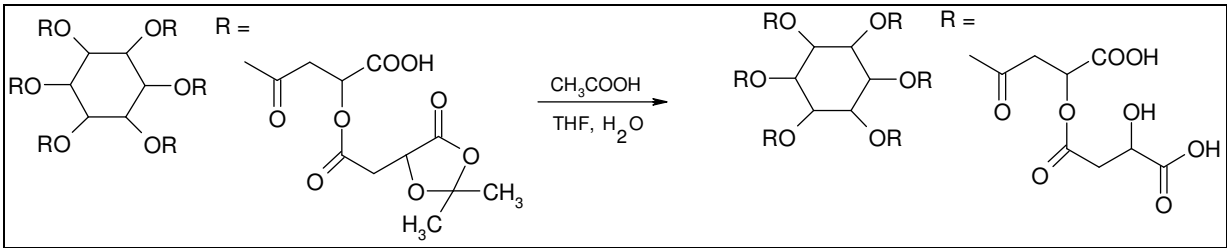


Figura 36: Hidrólise do intermediário II, síntese do intermediário III.

O produto obtido na reação anterior foi dissolvido em solução de ácido acético, tetraidrofurano e água (1:1:1, v/v/v). A mistura reacional foi submetida à agitação, à temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, o meio reacional foi concentrado sob pressão reduzida, a 50 ºC.

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

3.2.1.3.5 Síntese do dendrímero dirigido com manose

- Ligação à manose (adaptado de DAMEN *et al.*, 2000; FERREIRA, GIAROLLA, 2008).

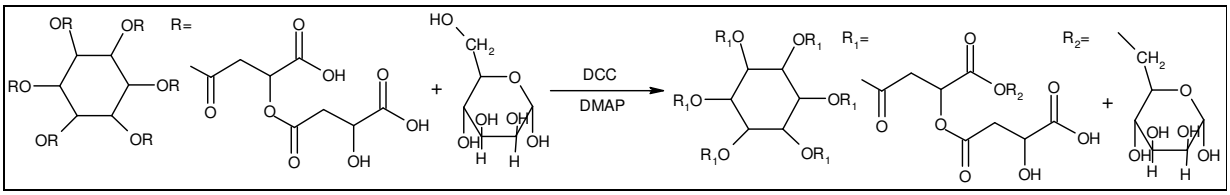


Figura 37: Ligação de manose ao intermediário III.

Partindo-se do intermediário III, em banho de gelo e sob agitação, adicionaram-se 30 mL de THF, DCC (1:6). Após 30 minutos, retirou-se o banho de gelo e juntaram-se *D*-manose na proporção de 1:6 e DMAP na proporção de 1:0,1, em relação ao intermediário III. A mistura reacional foi submetida à agitação por 24 horas. Após este período, adicionaram-se 30 mL de éter dietílico, sob agitação. Filtrou-se o meio reacional para remover o DCU. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 50 ºC.

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

3.2.1.3.6 Síntese do dendrímero dirigido com inositol

❖ Ligação de inositol ao intermediário III (adaptado de DAMEN *et al.*, 2000; FERREIRA, GIAROLLA, 2008).

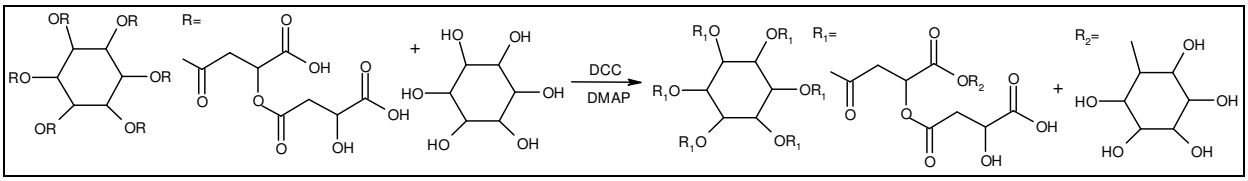


Figura 38: Ligação de inositol ao intermediário III.

A partir do intermediário III, em banho de gelo e agitação constante, adicionaram-se 30 mL de THF e DCC na proporção de 1:6, com relação ao intermediário III obtido. Após 30 minutos, adicionou-se DMAP na proporção de 1:0,1 e *mio*-inositol na proporção de 1:6, em relação ao intermediário. A mistura reacional foi submetida à agitação por 24 horas e acompanhada por CCD (fase móvel clorofórmio/metanol 2:1 v/v). Ao término da reação, juntaram-se 30 mL de éter dietílico. O produto foi filtrado para remover o DCU e concentrado sob pressão reduzida.

3.2.1.4 *Síntese dos fármacos dendriméricos dirigidos – método convergente*

3.2.1.4.1 Síntese do intermediário IV

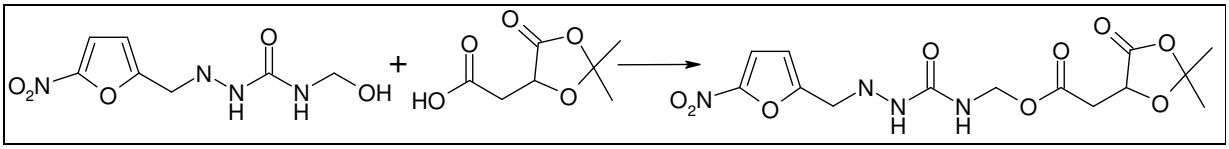


Figura 39: Síntese do intermediário IV.

❖ Método G – com NFOH

Em banho de gelo e sob atmosfera de argônio, adicionou-se a solução de *N*-metilmorfolina (0,47 mmol) em 1 mL de THF à solução de ácido málico protegido (0,47

mmol) dissolvido em 3 mL de THF. Agitou-se por 15 minutos, adicionando-se, então, o cloroformato de etila (0,47 mmol) solubilizado em 1 mL de THF. Manteve-se a agitação por mais 30 minutos e adicionou-se o NFOH (0,47 mmol). A reação foi mantida sob agitação e banho de gelo por mais 1 hora. O meio reacional foi mantido sob agitação constante, proteção da luz e à temperatura ambiente, por 24 horas. O produto foi lavado com metanol e filtrado sob pressão reduzida.

O experimento foi acompanhado por CCD, utilizando como fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético (85:10:5).

❖ Esterificação *in situ*

Primeira etapa – Síntese do NFOH (TROSSINI *et al.*, 2010b).

Nitrofural (5,00 mmol), carbonato de potássio (7,50 mmol) e água (10 mL) foram adicionados ao meio reacional. Formaldeído (18 mL) foi colocado em duas etapas, 9 mL no início da reação e 9 mL na metade do tempo total de síntese, ou seja, três horas e trinta minutos. Manteve-se o meio reacional em agitação constante com proteção da luz e à temperatura ambiente, por 7 horas.

O experimento foi acompanhado por CCD, utilizando como fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético (85:10:5).

⇒ Método H – com cloroformatos para síntese dos ésteres

Segunda etapa – Ativação do ácido málico protegido (adaptado de VARGAS, 2007)

Em outro balão, adicionou-se, em banho de gelo à solução de *N*-metilmorfolina (5,50 mmol) em 1 mL de THF à solução de ácido málico protegido (5,50 mmol) dissolvido em 3 mL de THF. Agitou-se por 15 minutos, adicionando-se, então, o respectivo cloroformato solubilizado em 1 mL de THF (Tabela IX). Manteve-se a agitação por mais 30 minutos.

Tabela IX – Cloroformatos utilizados nos experimentos H1 e H2

Experimento	Cloroformato	mmol
H1	cloroformato de etila	5,50
H2	4-nitrofenilcloroformato	5,50

Terceira etapa – Tentativa de esterificação

Adicionou-se ao meio reacional da primeira etapa o ácido málico protegido ativado. Manteve-se sob agitação, à temperatura ambiente, e proteção da luz, por 24 horas. O produto foi lavado com metanol e filtrado à pressaõ reduzida.

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

⇒ Método I – Esterificação de Fisher

Adicionaram-se ao meio reacional da primeira etapa 7 gotas de solução de ácido sulfúrico a 20% e o ácido málico protegido (5,50 mmol). Manteve-se o meio reacional em agitação, em temperatura ambiente e proteção da luz, por 24 horas. O produto foi lavado com metanol e filtrado à pressão reduzida.

O experimento foi acompanhado por CCD, utilizando como fase móvel clorofórmio/metanol/ácido acético (85:10:5).

3.2.2 Métodos de análise

3.2.2.1 *Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

A análise de RMN ^{1}H e ^{13}C dos produtos formados 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 *Espectrofometria no Infravermelho (IV)*

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

3.2.2.3 *Cromatografia em Camada Delgada (CCD)*

A análise cromatográfica em camada delgada foi realizada com cromatoplacas de sílica-gel G-60, marca Merck, com as fases móveis apropriadas e descritas anteriormente.

3.2.3 Modelagem molecular

Os estudos de modelagem molecular contaram com a colaboração da Dra. Jeanine Giarolla Vargas, da FCF, USP, e da Dra. Kerly F. M. Pasqualoto, do Instituto Butantan.

3.2.3.1 *Estudo de liberação dos dendrímeros dirigidos de primeira geração* (GIAROLLA *et al.*, 2010).

As estruturas tridimensionais dos dendrímeros dirigidos de primeira geração com uma, duas, três, quatro, cinco e seis ramificações de NFOH (agente bioativo) e grupo diretor (*mio*-inositol e manose) foram construídas usando o *software* HyperChem 7.51. As estruturas cristalografadas de *mio*-inositol (grupo diretor e foco central), *D*-manose (grupo diretor), ácido málico (agente espaçante) foram obtidas do banco de dados de estruturas químicas *Protein Data Bank* (PDB) e utilizadas como padrões de geometria para a construção dos modelos tridimensionais com os seguintes códigos de entrada: 3HO6 (PRUIT *et al.*, 2009), 3M8M (SUNDARAMOORTHY, GOLD, POULOS, 2010), 3DR3 (SINGER *et al.*, 2009) e resolução 1,60, 1,05, 1,45 Å, respectivamente.Utilizou-se a estrutura cristalografada do NFOH obtido por Doriguetto *et al.* (2005). A minimização de energia de cada modelo (uma a seis ramificações de NFOH e grupo diretor *mio*-inositol e NFOH e grupo diretor *D*-manose) foi realizada por mecânica molecular com campo de força Mecânica Molecular (MM+), por meio dos *softwares* HyperChem 7,51 e MOLSIM 3,2 (DOHERTY, 1997). As cargas atômicas parciais foram calculadas utilizando o método semiempírico AM1, também implementado no programa HyperChem 7,51.

Os modelos obtidos com menor energia foram utilizados como estrutura inicial para a realização das simulações de dinâmica molecular (DM), realizadas utilizando o

protocolo de 1 ns, cada passo de 1 fs a 300 K. Os arquivos de trajetória foram gerados a cada 20 passos, resultando em 50.000 conformações para cada modelo. A partir do perfil de amostragem conformacional, extraíram-se as conformações de menor energia para cada modelo da região de equilibração. Os confômeros de menor energia foram utilizados para os cálculos de cargas de potencial eletrostático (ChelpG – *Potential Electrostatic Charges*) usando o método *ab initio* HF/3-21G*, por meio do *software* Gaussian G03W. O potencial eletrostático (PE) foi mapeado em superfície *Connolly* para cada modelo. A escala utilizada no mapa de potencial eletrostático variou de -7,5 a 7,5 eV^{-2} e os valores negativos de potencial eletrostático (alta densidade eletrônica) são representados em vermelho, enquanto os valores positivos estão em azul (baixa densidade eletrônica).

O *software* ViewerLite 4.2 foi utilizado para: determinação das ligações de hidrogênio, visualização do modelo CPK e da superfície de acessibilidade ao solvente para análise de impedimento estérico dos dendrímeros dirigidos construídos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.

Albert Einstein

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

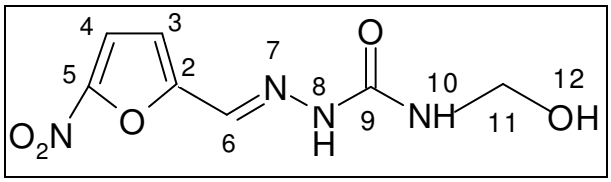
4.1 Síntese

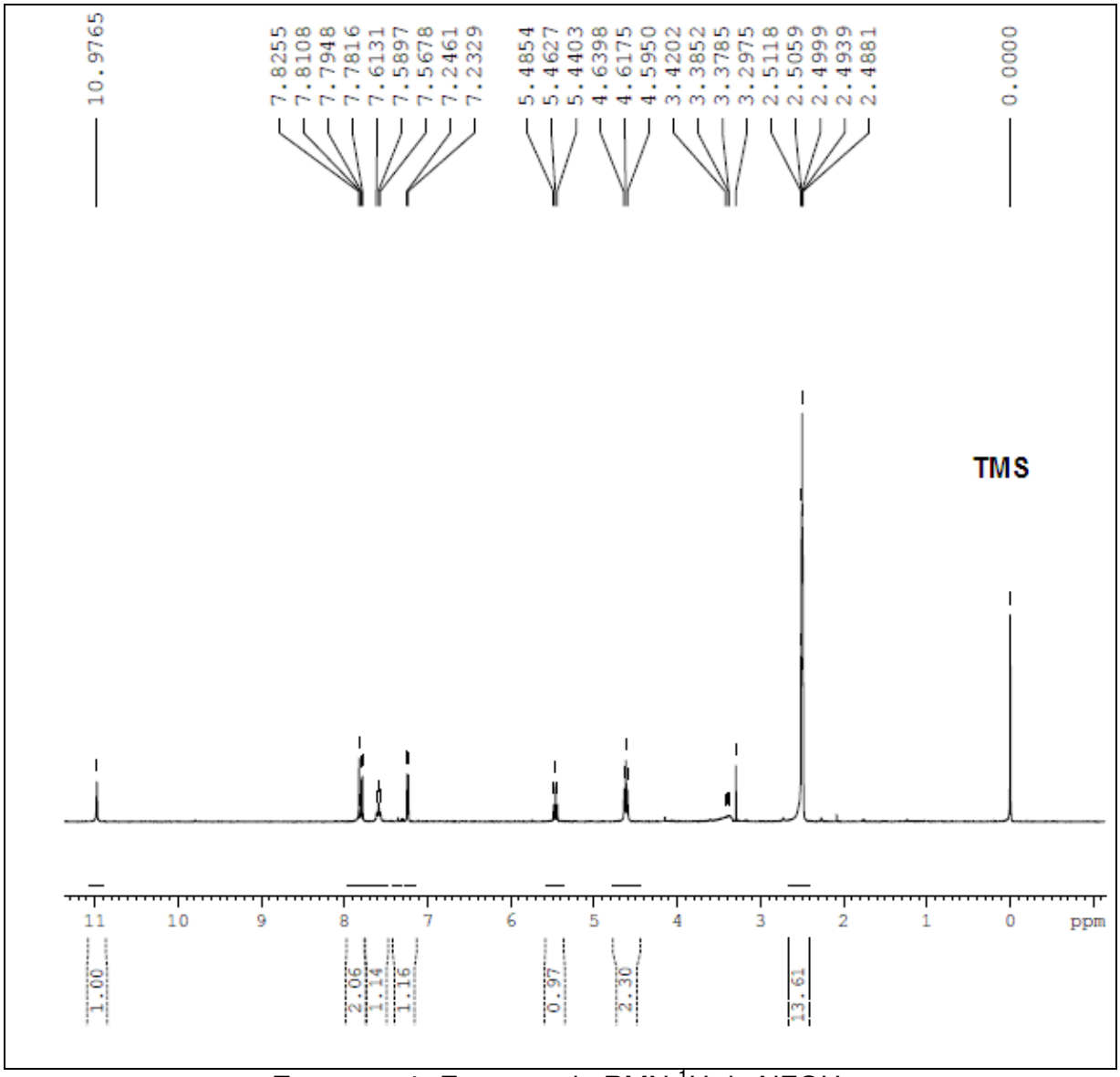
4.1.1 *Síntese do derivado hidroximetilnitrofural (NFOH) (Figura 31)*

O NFOH, sintetizado em nosso Laboratório e considerado pró-fármaco potencial do NF, apresenta promissora atividade antichagásica e leishmanicida (CHUNG *et al.*, 2003; SANTOS, 2005; SANTOS *et al.*, 2010). Este derivado foi utilizado neste trabalho como a porção bioativa do dendrímero dirigido de primeira geração proposto como potencialmente leishmanicida.

A síntese do NFOH foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. Durante sua síntese, observaram-se duas manchas com valor de R*f* igual a 0,84 e 0,69. A mancha com R*f* de 0,84 é referente ao nitrofural, material de partida. Já, o valor de R*f* de 0,69 corresponde ao derivado hidroximetilado, pois este composto apresenta maior polaridade que seu precursor, devido à introdução do grupo hidroximetilênico. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 1) confirmou a obtenção do derivado hidroximetilado de nitrofural, devido à presença do tripleto em 4,61 ppm, referente aos hidrogênios do grupo metilênico, e outro tripleto em 5,46 ppm, relacionado ao grupamento hidroxila introduzido no nitrofural. No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 2) evidencia-se um sinal em 63,18 ppm, referente ao carbono CH_2 do grupo metilênico introduzido.

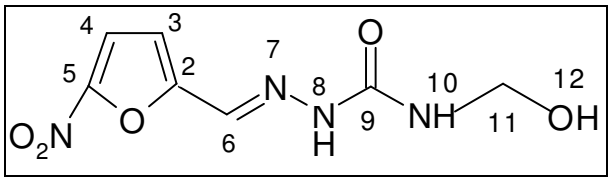
O produto desta reação apresentou aspecto de pó de cor amarela intensa, obtido com rendimento de 70%.

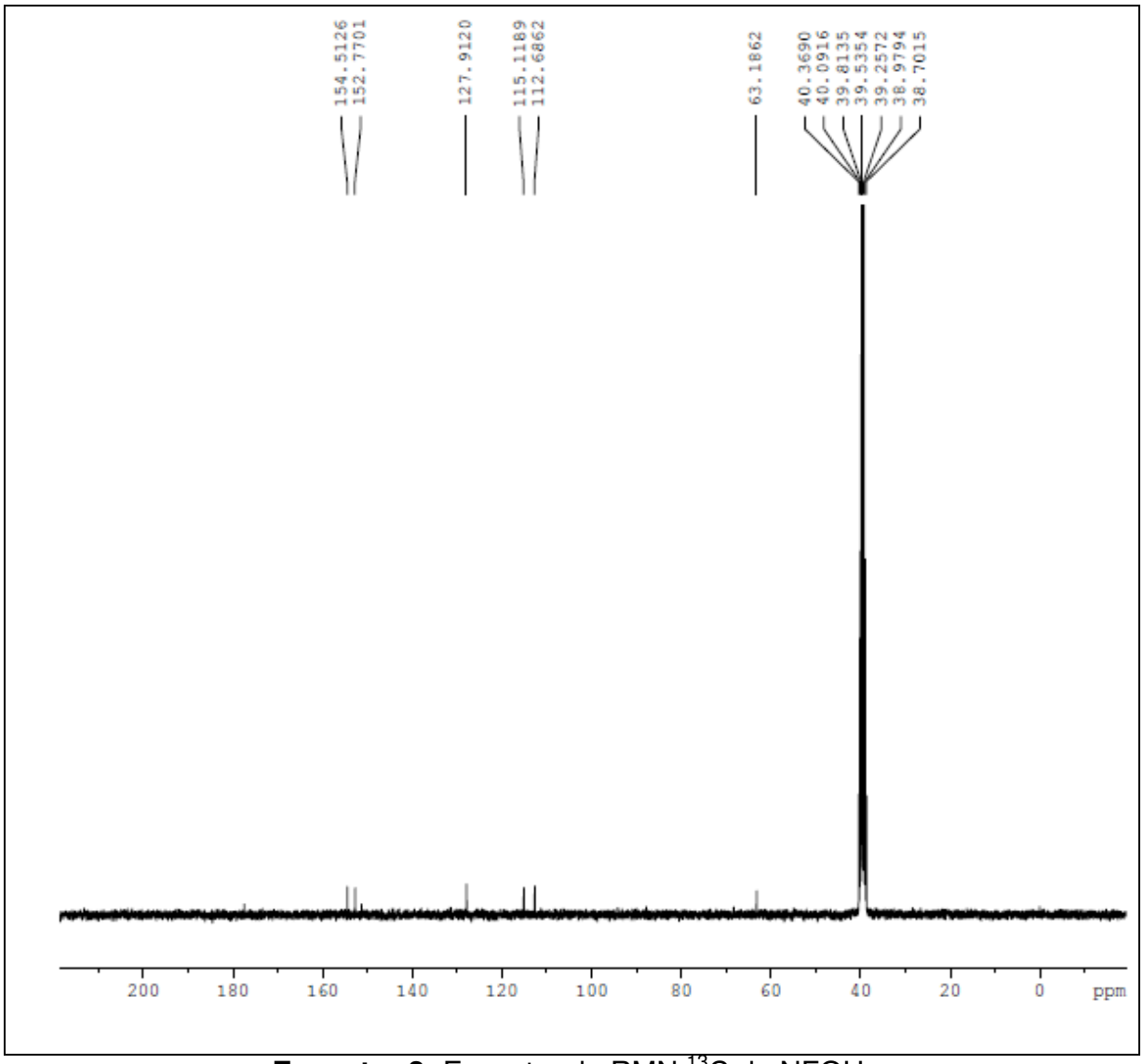




Espectro 1: Espectro de RMN ^{1}H de NFOH.

RMN ^{1}H (DMSO), 300 MHz, δ = ppm
2,50 (DMSO-d_6); 3,29 (H_2O); 4,61 (t, 2H, H_{11}, J = 6 Hz); 5,46 (t, 1H, H_{12}, J = 6 Hz); 7,24 (d, 1H, H_3, J = 3 Hz); 7,58 (t, 1H, H_{10}, J= 6 Hz); 7,78 (s, 1H, H_6); 7,81 (d, 1H, H_4, J= 3); 10,97 (s, 1H, H_8).





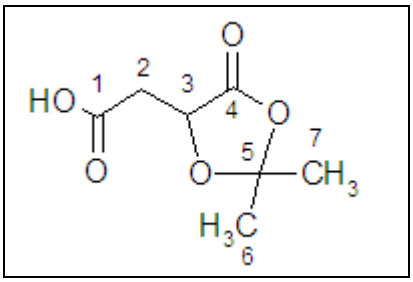
Espectro 2: Espectro de RMN ^{13}C de NFOH.

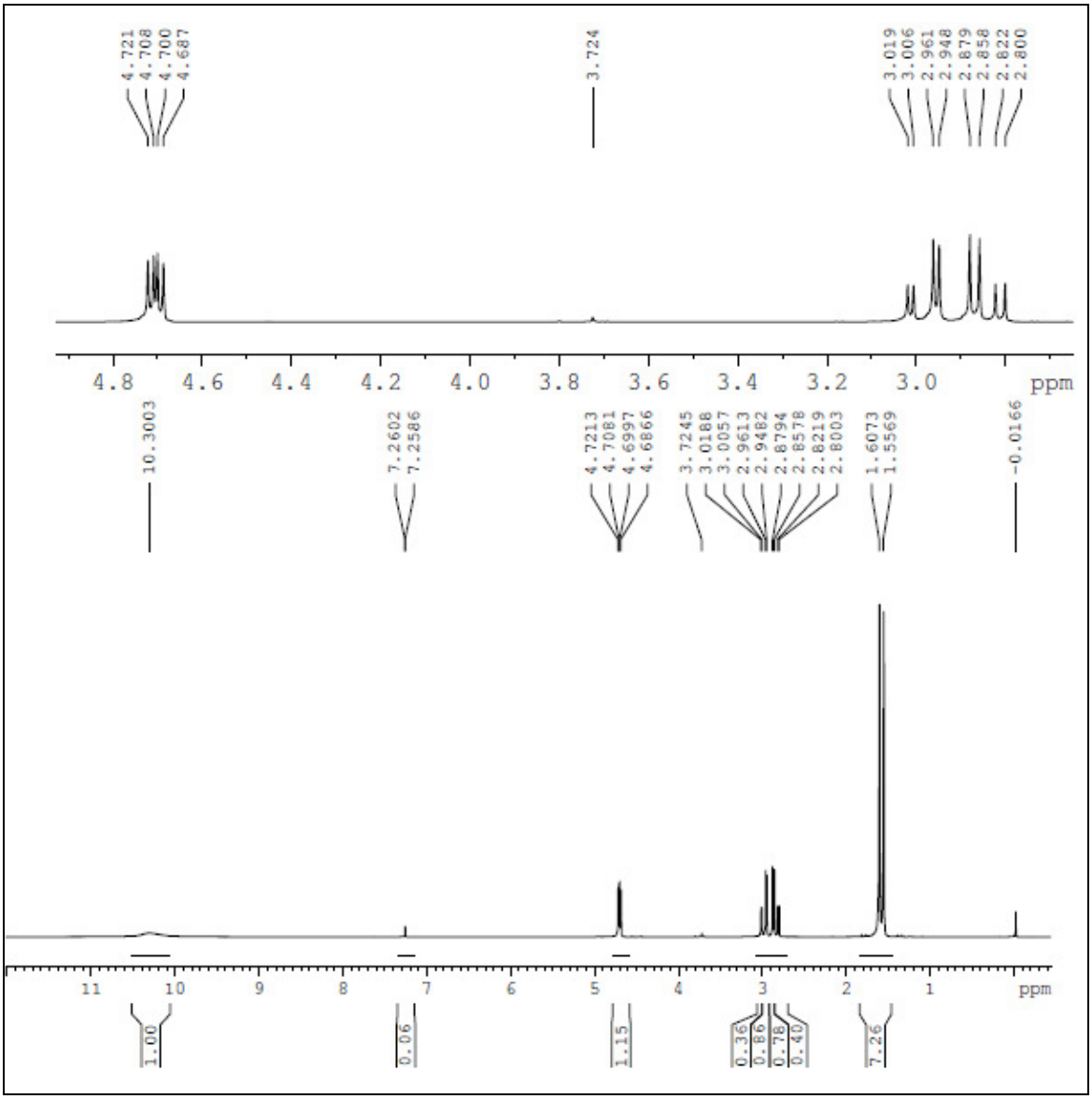
RMN ^{13}C (DMSO), 75 MHz, δ = ppm
39,53 (DMSO-d_6); 63,18 (C_{11}); 112,68 (C_4); 115,11 (C_3); 127,91 (C_6); 152,77 (C_5); 154,51 (C_9).

4.1.2 *Síntese do ácido 2-(2,2-dimetil-5-oxo-1,3-dioxolan-4-ila)acético (ácido málico protegido) (Figura 32)*

O ácido málico é importante na síntese dos dendrímeros, pois atua como *dendron* e agente espaçante. As carboxilas presentes no ácido málico proporcionam a ligação tipo éster com o foco central (*mio*-inositol), bem como ligação aos grupos diretores externos (inositol e manose) e ao composto bioativo (NFOH). Além disso, este apresenta uma hidroxila no C_3, que permite o aumento das gerações dos dendrímeros propostos. Entretanto, esta hidroxila possibilita a ocorrência de reações cruzadas. Portanto, para promover a seletividade da carbonila em reagir com o *mio*-inositol (grupo diretor e foco central), *D*-manose (grupo diretor) ou composto com atividade (NFOH) e evitar reações cruzadas, realizou-se a reação para formação da lactona (proteção) e obtenção do ácido málico protegido (GIAROLLA, 2007).

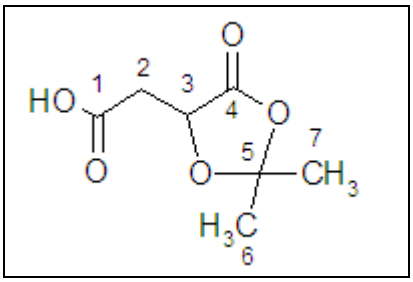
A cromatografia de camada delgada mostrou mancha com R*f* de 0,23, valor diferente do material de partida (ácido málico) de 0,15. O R*f* de 0,23 mostra a formação de material com caráter mais apolar que o material de partida, o que sugere a obtenção do ácido málico protegido. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 3) apresentou singletos em 1,55 e 1,60 ppm, correspondentes aos hidrogênios H_6 e H_7 das metilas da lactona presente no ácido málico protegido. No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 4) apareceram os sinais em 35,99 ppm, relativo ao C_5, em 25,81 ppm, referente ao C_6, e em 26,75 ppm, que refere-se a C_7 da lactona do ácido málico protegido. O produto foi obtido com sucesso e apresentou aspecto de cristal agulha de cor branca e rendimento em torno de 60%.

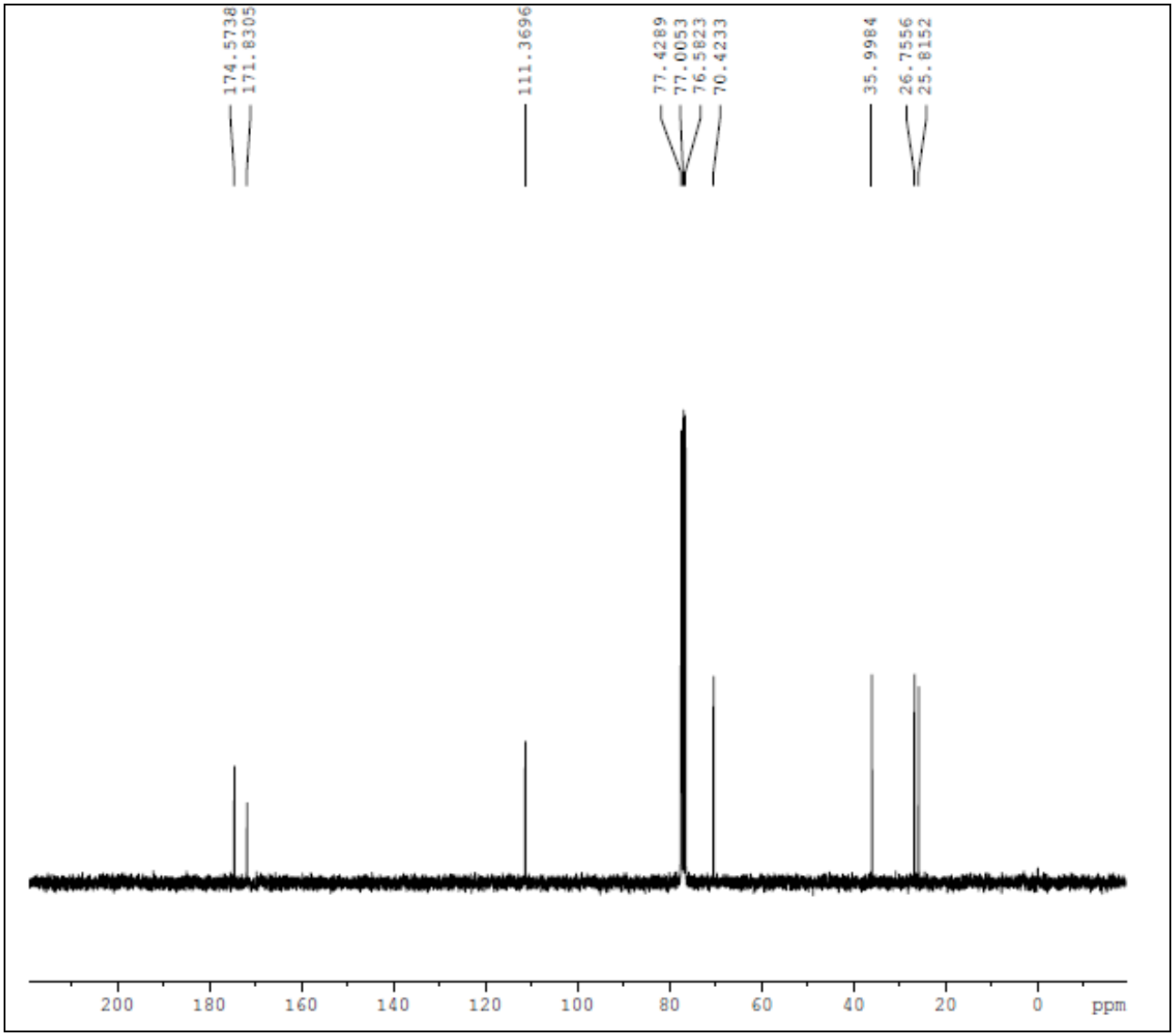




Espectro 3: Espectro de RMN ^{1}H de ácido málico protegido.

RMN ^{1}H ($CDCl_3$), 300 MHz, δ = ppm
7,26 ($CDCl_3$); 1,55, 1,60 (s, 6H, H_6, H_7); 2,81 (dd, 1H, H_2, J = 17 Hz, J = 6 Hz); 3,00 (dd, 1H, H_2, J = 17 Hz, J=3 Hz); 4,70 (dd, 1H, H_3, J = 6 Hz, J = 3 Hz).





Espectro 4: Espectro de RMN ^{13}C de ácido málico protegido.

RMN ^{13}C ($CDCl_3$), 75 MHz, δ = ppm
77,00 ($CDCl_3$); 25,81 (C_7); 26,75 (C_6); 35,99 (C_2); 70,42 (C_5); 111,36 (C_3); 171,83 (C_1); 174,57 (C_4).

4.1.3 *Síntese dos fármacos dendriméricos dirigidos – método divergente (Figura 33)*

As tentativas de obtenção dos fármacos dendriméricos dirigidos foram realizadas pelos métodos convergente e divergente. A abordagem divergente consiste no crescimento das ramificações a partir de um foco central. Como descrito por Giarolla (2007), o método divergente apresenta vantagem, em relação à síntese pelo método convergente, pois as etapas de formação do dendrímero não depedem do composto bioativo (NFOH) para formação das ramificações. Pode-se, em proporções estequiométricas, adicionar o NFOH, na última etapa reacional. Portanto, o método divergente preserva o fármaco, o que é importante principalmente em relação ao NFOH, que é instável na presença de luz, temperatura e condições drásticas de pH.

4.1.3.1 Síntese do intermediário I (Figura 33)

4.1.3.1.1 Método A - DCC como agente condensante

⇒ Experimento A1

Na patente de Ferreira e Giarolla (2008) está descrita a síntese de fármacos dendriméricos com a utilização de DCC/DMAP, portanto este trabalho foi iniciado fazendo uso destes, como agente condensante e catalisador, respectivamente.

O intermediário I é formado pela esterificação entre inositol e ácido málico protegido.

No experimento A1 utilizou-se a quantidade de inositol e ácido málico protegido na proporção de 1:6, respectivamente, devido ao número de hidroxilas disponíveis no inositol, com objetivo de obter o maior número de substituições possíveis. As placas cromatográficas, após 24 horas de reação, mostraram a formação de duas manchas com R*f* de 0,47 e 0,78, diferentes do valor encontrado para o material de partida, ácido málico protegido, que apresenta R*f* de 0,23. A mancha com R*f* de 0,78 pode ser referente ao intermediário inositol-ácido málico protegido de interesse. A outra mancha corresponde ao subproduto formado pela reação com DCC, o DCU (*N,N´*-dicicloexiluréia). O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 5) apresentou excesso de sinais, devido à presença de impurezas dos procedimentos reacionais (provável DCU formado, subproduto da reação). Entretanto, os sinais em

1,54 e 1,56 ppm relacionam-se a H_6 e H_7 do ácido málico protegido, bem como sinais em 2,80 e 4,76 ppm caracterizam, respectivamente, H_2 e H_3 do ácido málico. Além disso, os sinais do inositol são observados próximos a 3,60 ppm, referentes aos hidrogênios presentes no anel, e em 4,80 ppm, correspondendo às hidroxilas livres. O mecanismo da reação do DCC, que gera a formação do DCU pode ser observado na Figura 40.

O produto formado tem aspecto oleoso de cor marrom escura. O rendimento bruto foi de 32%.

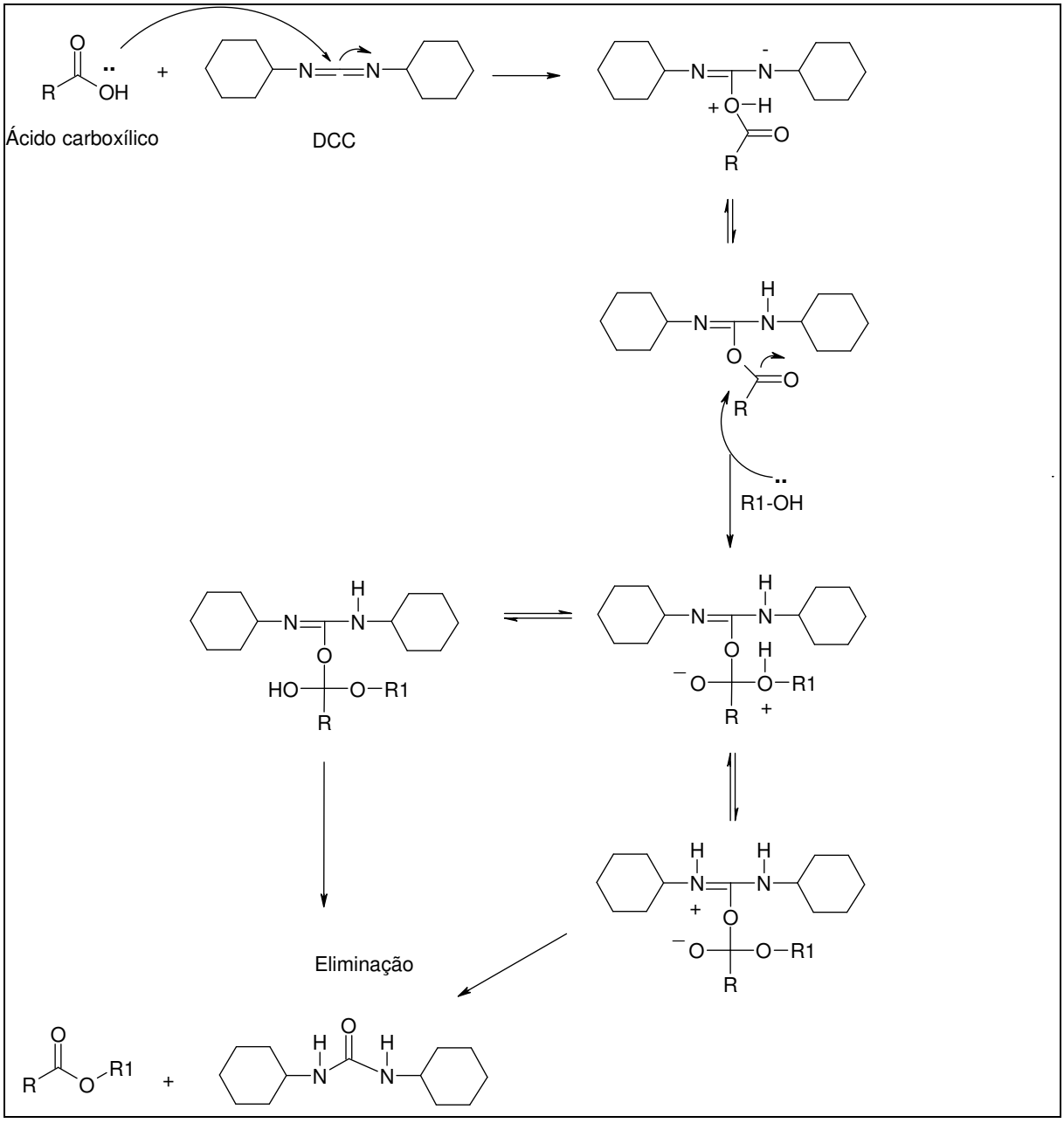
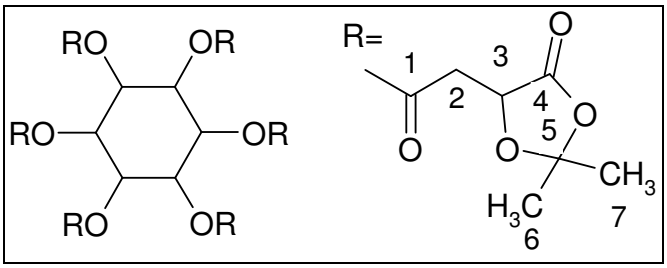
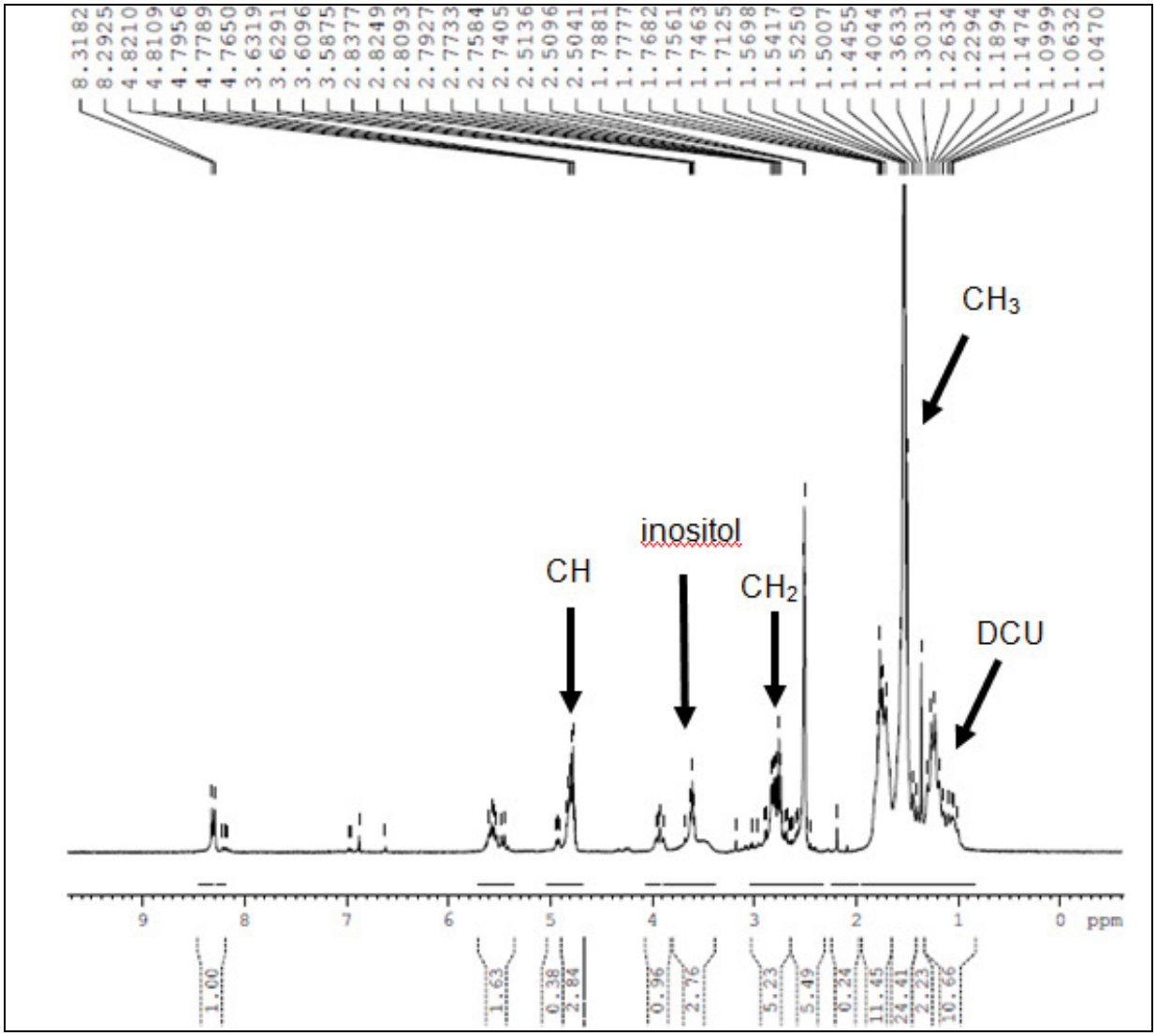


Figura 40: Mecanismo de esterificação com o uso de DCC (GIAROLLA, 2012).





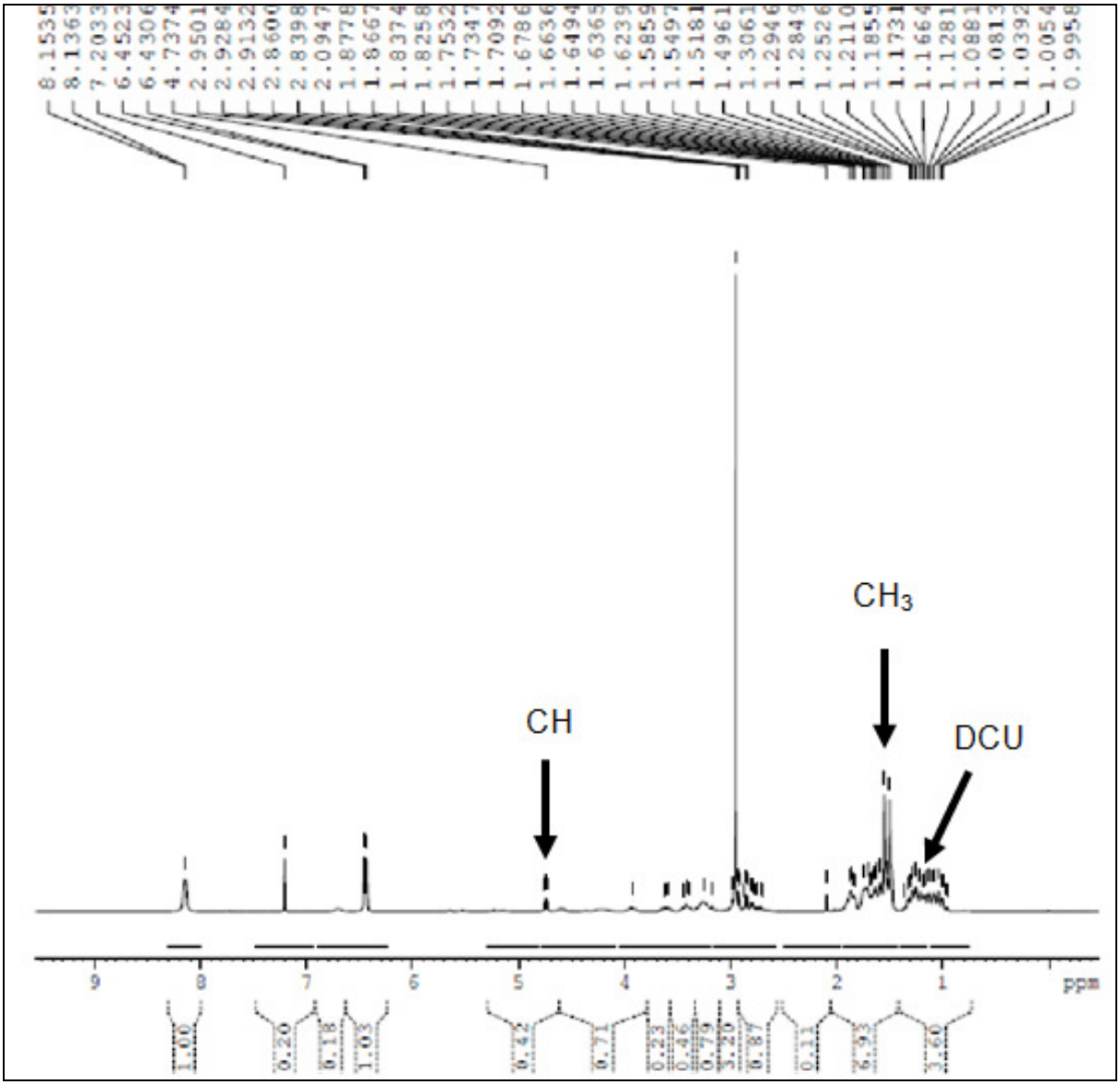
Espectro 5: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, obtidos com o experimento A1, que utiliza DCC como agente condensante.

⇒ Experimentos A2, A3, A4 e A5

Nos experimentos A2, A3 e A4, utilizou-se a quantidade de inositol e ácido málico protegido na proporção molar de 1:1, com o objetivo de reproduzir o protocolo realizado pelos artigos utilizados e, também, obter alguma substituição do *mio*-inositol, para determinar as condições reacionais. Assim, com as condições reacionais estabelecidas, as proporções molares poderiam ser reajustadas, para a obtenção do maior número de substituições, o que é mais interessante para a síntese de dendrímeros.

No experimento A2, a cromatografia em camada delgada mostrou a formação de três manchas com valores de R*f* iguais a 0,23, 0,50 e 0,80. A mancha com R*f* de 0,23 é relativa ao material de partida ácido málico que não reagiu. A outra mancha com R*f* de 0,50, possivelmente, está relacionada ao subproduto DCU. O que sugere que a mancha com valor de R*f* equivalente a 0,80, pode ser referente à obtenção do intermediário inositol-ácido málico protegido de interesse.

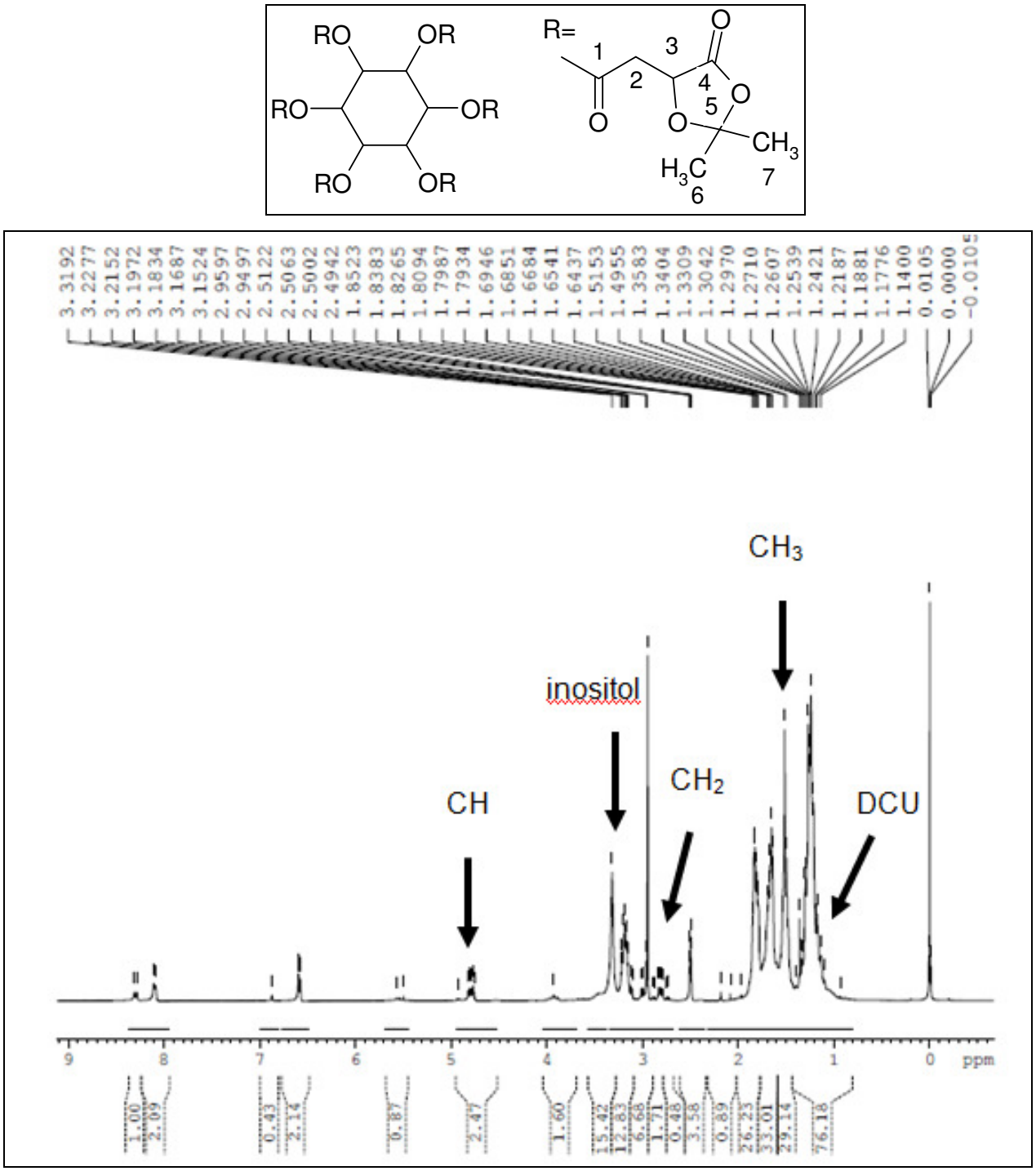
No entanto, apesar dos indicíos de formação do intermediário I, observados na placa cromatográfica, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 6) do composto obtido indicou que o intermediário inositol-ácido málico protegido não foi obtido. O RMN ^{1}H desta reação apresentou excesso de sinais, devido à presença de impurezas da reação (subproduto DCU). Além disso, o espectro apresentou sinais que indicam a presença do ácido málico protegido em 1,51 e 1,54 ppm, relacionados aos hidrogênios da lactona, e também, sinais em 4,70 ppm, relativos aos hidrogênios do carbono 3, mesmo que em baixa intensidade. Entretanto, o espectro não apresenta sinais referentes ao anel do inositol.



Espectro 6: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, obtidos pelo experimento A2, que utiliza DCC como agente condensante.

No experimento A3, a cromatografia em camada delgada do produto obtido após 4 horas de reação mostrou três manchas. As manchas apresentaram valores de R*f* de 0,23, 0,49 e 0,80, que podem estar relacionadas, respectivamente ao ácido málico protegido que não reagiu, ao DCU e ao intermediário desejado.

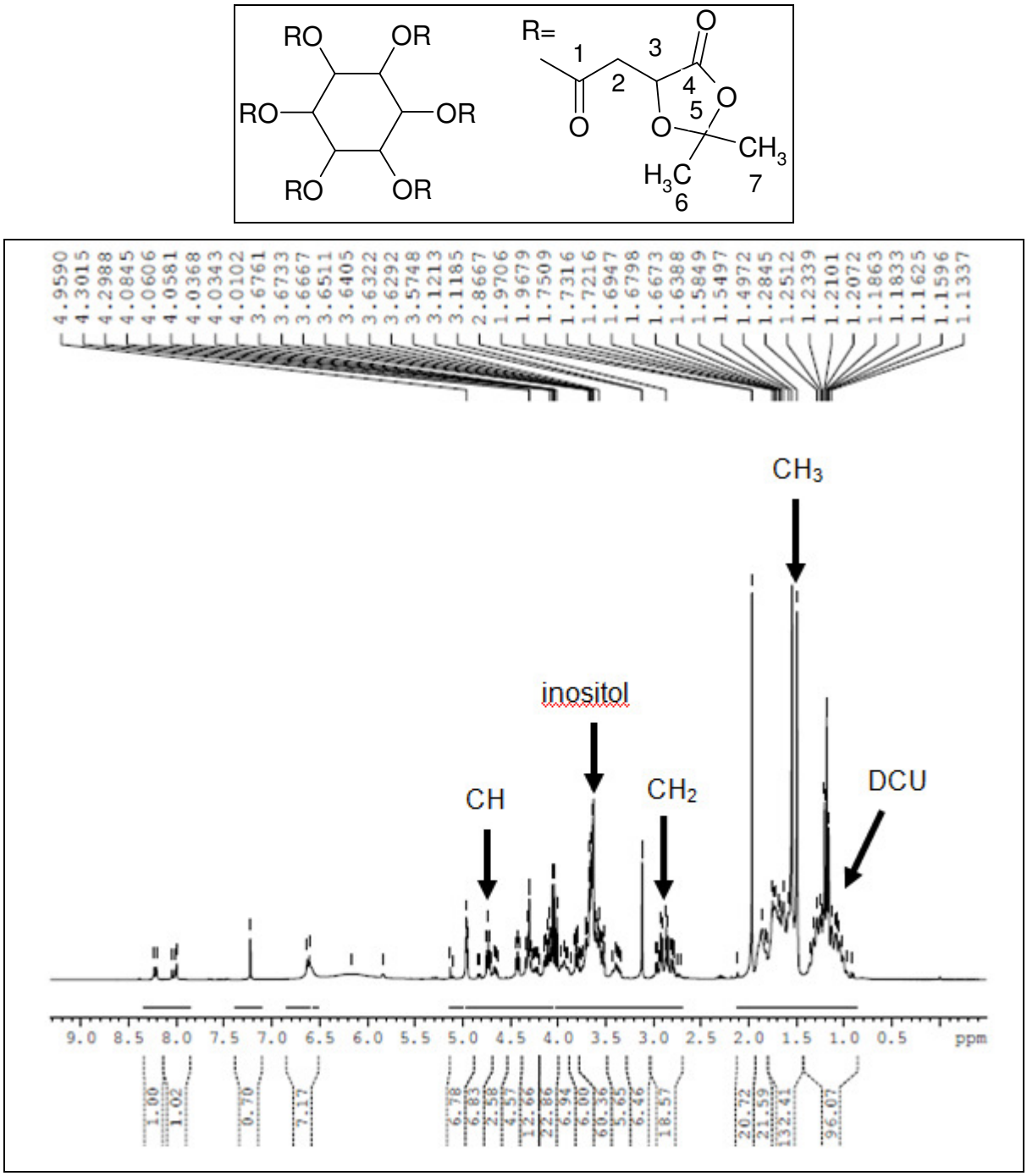
O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 7) apresentou excesso de sinais, principalmente na região entre 1,00 e 2,00 ppm, devido a subprodutos reacionais, como o DCU, o que dificulta sua interpretação. Entretanto, é possível observar a presença de sinais em 1,49 e 1,51 ppm, que podem estar relacionados aos hidrogênios metilênicos do ácido málico protegido. Além disso, observam-se os sinais, provavelmente, referentes aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 do espaçante em 2,80 e entre 4 e 5 ppm, respectivamente. Também, são observados sinais entre 3-4 ppm, que podem ser relativos aos hidrogênios do anel do inositol. Estes indícios sugerem a obtenção do intermediário I, mesmo que impuro.



Espectro 7: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, obtidos pelo experimento A3, que utiliza DCC como agente condensante.

Após 15 horas de reação, a análise cromatográfica do produto obtido pelo experimento A4 mostrou a formação de duas manchas com Rf equivalentes a 0,46 e 0,79, valores diferentes dos materiais de partida. A mancha com Rf de 0,46, provavelmente, corresponde ao DCU formado no meio reacional. A outra mancha com valor de Rf igual a 0,79 indica a obtenção de um composto com caráter mais apolar, o que sugere a obtenção do intermediário I desejado.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 8) mostrou a presença dos sinais em 1,54 e 1,58 ppm, que correspondem aos hidrogênios das metilas presentes no ácido málico protegido. Em adição, observa-se sinal, provavelmente, referente ao H_2 em 2,86 ppm, do agente espaçante. Também, observam-se sinais que podem estar relacionados aos hidrogênios do anel do inositol, na região de 3,60 ppm. Em adição, o espectro de RMN ^{1}H apresenta excesso de sinais que correspondem ao DCU. Estes índicios sugerem a formação do intermediário inositol-ácido málico protegido, embora bastante impuro.



Espectro 8: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, obtidos pelo experimento A4, que utiliza DCC como agente condensante.

O experimento A5 foi realizado conforme descrito por Delong, McFadden (2007), em que a proporção molar utilizada foi de 1:1,5 de ácido málico protegido e *mio*-inositol, respectivamente.

A cromatografia em camada delgada do composto obtido neste experimento apresentou a formação de duas manchas com R*f* de 0,50 e 0,79. A mancha com R*f* de 0,50 deve estar relacionada ao DCU e a mancha com R*f* igual a 0,79 revela a formação de produto com caráter mais apolar, o que indica a síntese do intermediário I de interesse.

Entre os experimentos realizados neste trabalho que empregam DCC, como agente condensante, o experimento A5 foi o que mostrou espectro de RMN ^{1}H (Espectro 9) menos impuro. No entanto, o espectro, ainda, apresenta sinais que estão relacionados ao DCU.

No Espectro 9, é possível observar a presença de sinais 1,63 e 1,65 ppm, referentes aos hidrogênios metilênicos da lactona do ácido málico protegido, bem como outros sinais relativos ao espaçante são observados em 2,92 e 4,71 ppm, que correspondem, respectivamente, aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 do ácido málico. Adicionalmente, no espectro estão presentes sinais na região de 3 e 4 ppm, provavelmente relacionados aos hidrogênios do anel do *mio*-inositol, o que indicou a formação do composto de interesse.

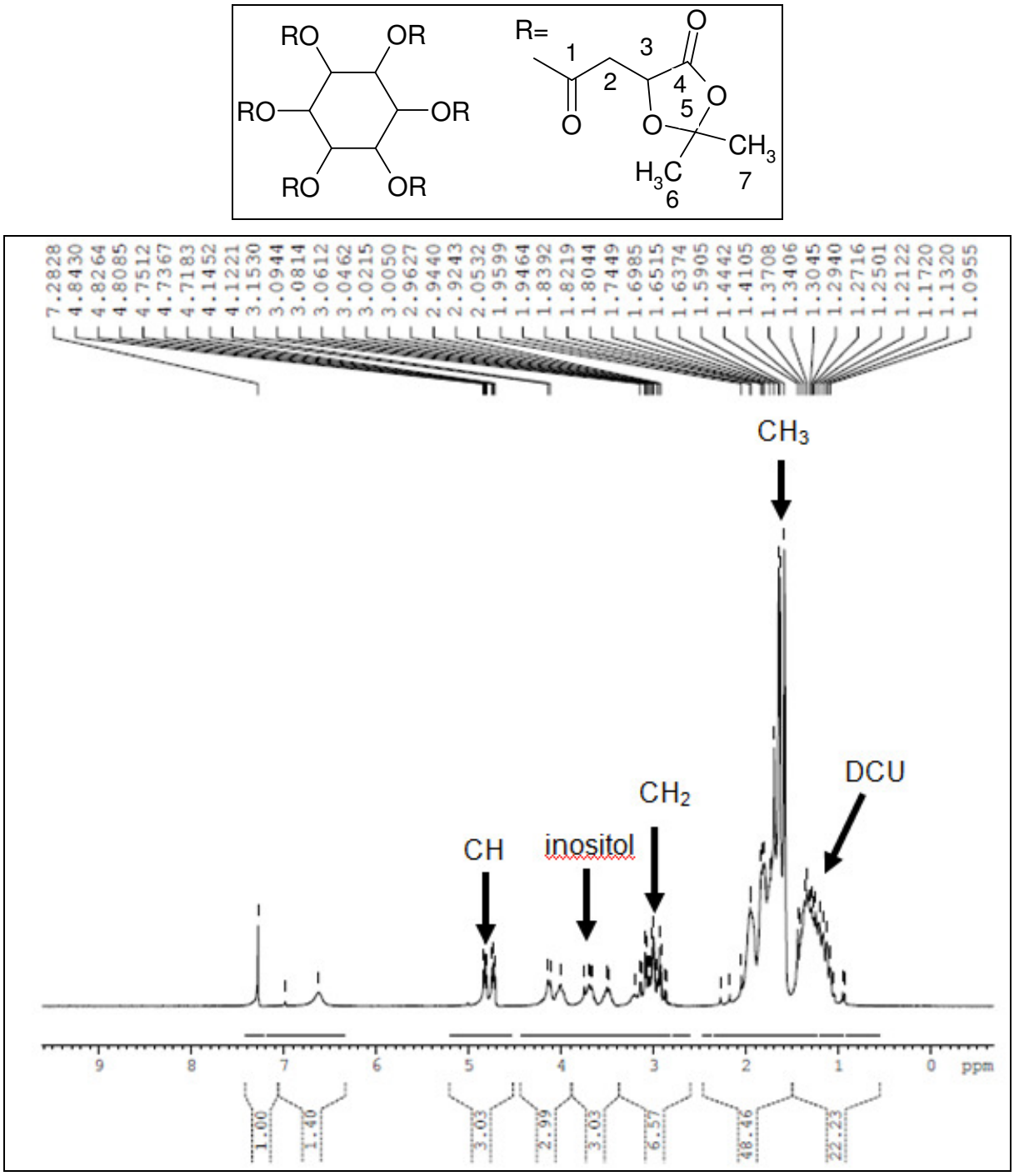
Com os indícios de obtenção do intermediário I pelo experimento A5, realizou-se a tentativa de purificação do composto em coluna cromatográfica com gradiente de concentração. O sistema solvente utilizado para a separação foi hexano/acetato de etila nas proporções 30:170, 60:140, 90:110, 120:80 e 150:50 mL, respectivamente. A coluna isolou mancha que na cromatografia em camada delgada apresentou R*f* de 0,79.

No espectro de RMN ^{1}H (Espectro 10) obtido da fração isolada da coluna, observam-se sinais que indicam a obtenção do intermediário inositol-ácido málico protegido em 1,65 e 1,66 ppm, referentes aos hidrogênios dos carbonos 6 e 7 do ácido málico protegido. Além disso, os sinais na região de 2,80 a 2,99 ppm e em 4,70 ppm são evidentes e correspondem, respectivamente, aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 do espaçante. Em adição, observam-se sinais na região de 3-4 ppm, indicativos dos hidrogênios do inositol. O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 11) apresentou os sinais dos carbonos metilênicos do ácido málico protegido entre 24 e 25 ppm, os sinais na região de 35 e 110 ppm, indicam a presença dos carbonos 2 e

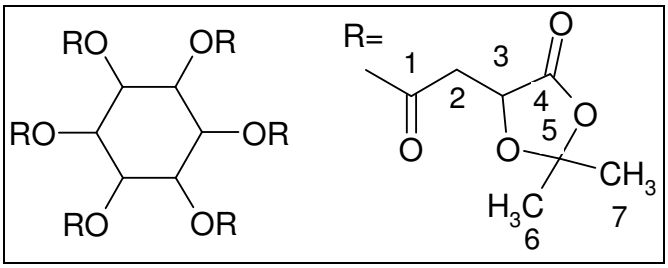
3 do ácido málico. Outra evidência de obtenção do composto de interesse são os sinais entre 169,47 e 172, 87 ppm, indicativos de carbonos carbonílicos do ácido málico protegido e da função éster formada. Ademais, os sinais dos carbonos do anel do inositol podem ser visualizados na região de 70-71 ppm.

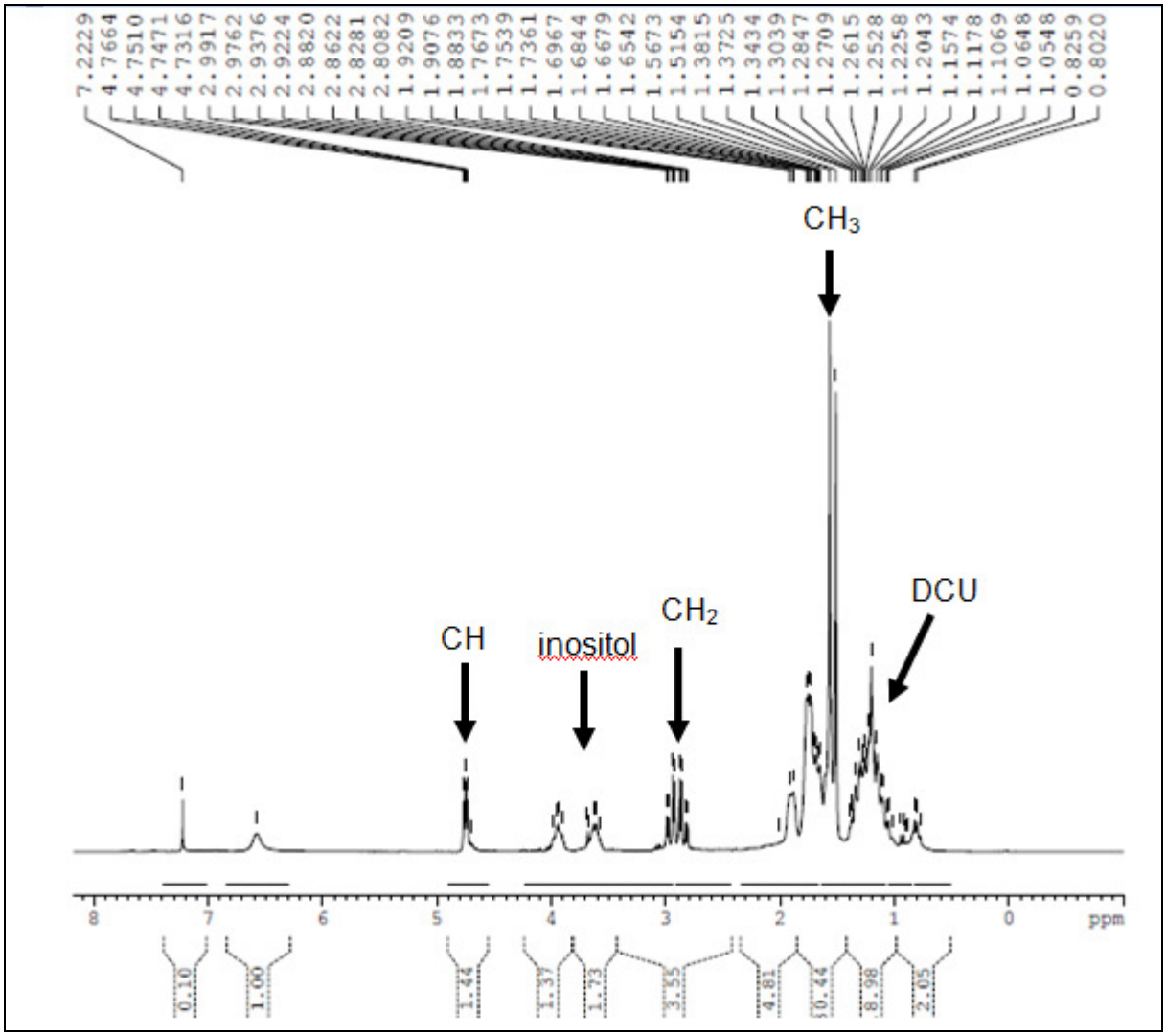
Entretanto, mesmo após a realização da primeira coluna, os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C apresentam sinais da presença do subproduto DCU nas regiões de 1-2 ppm e 20-40 ppm, respectivamente, o que mostra que o composto de interesse não está totalmente puro.

Com o intuito de retirar o DCU, realizou-se outra coluna cromatográfica, partindo da fração isolada da cromatografia anterior. A coluna foi realizada utilizando-se, novamente, hexano/acetato de etila como eluente e em gradiente de concentração com variação de 10% na concentração dos solventes a cada adição. Portanto, as proporções utilizadas de hexano/acetato de etila foram: 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 e 0:100 mL, respectivamente. Entretanto, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 12) da fração de interesse mostrou, ainda, a presença dos sinais na região de 1 e 2 ppm, referentes ao DCU no composto submetido a duas colunas, além dos sinais que correspondem ao intermediário I de interesse, o que levou à conclusão de que a ténica não foi eficiente para purificação. O agente condensante DCC é um dos mais utilizados na literatura para as reações de esterificação, no entanto, este composto forma DCU, subproduto de difícil purificação. Dessa forma, devido à dificuldade de purificação dos compostos sintetizados com DCC, optou-se pela busca de novos métodos para síntese do intermediário I, que apresentassem reações mais limpas e produtos de mais fácil purificação.

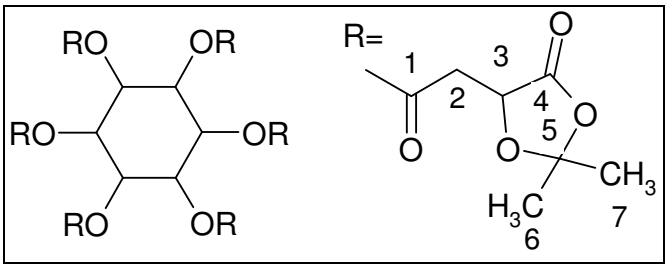


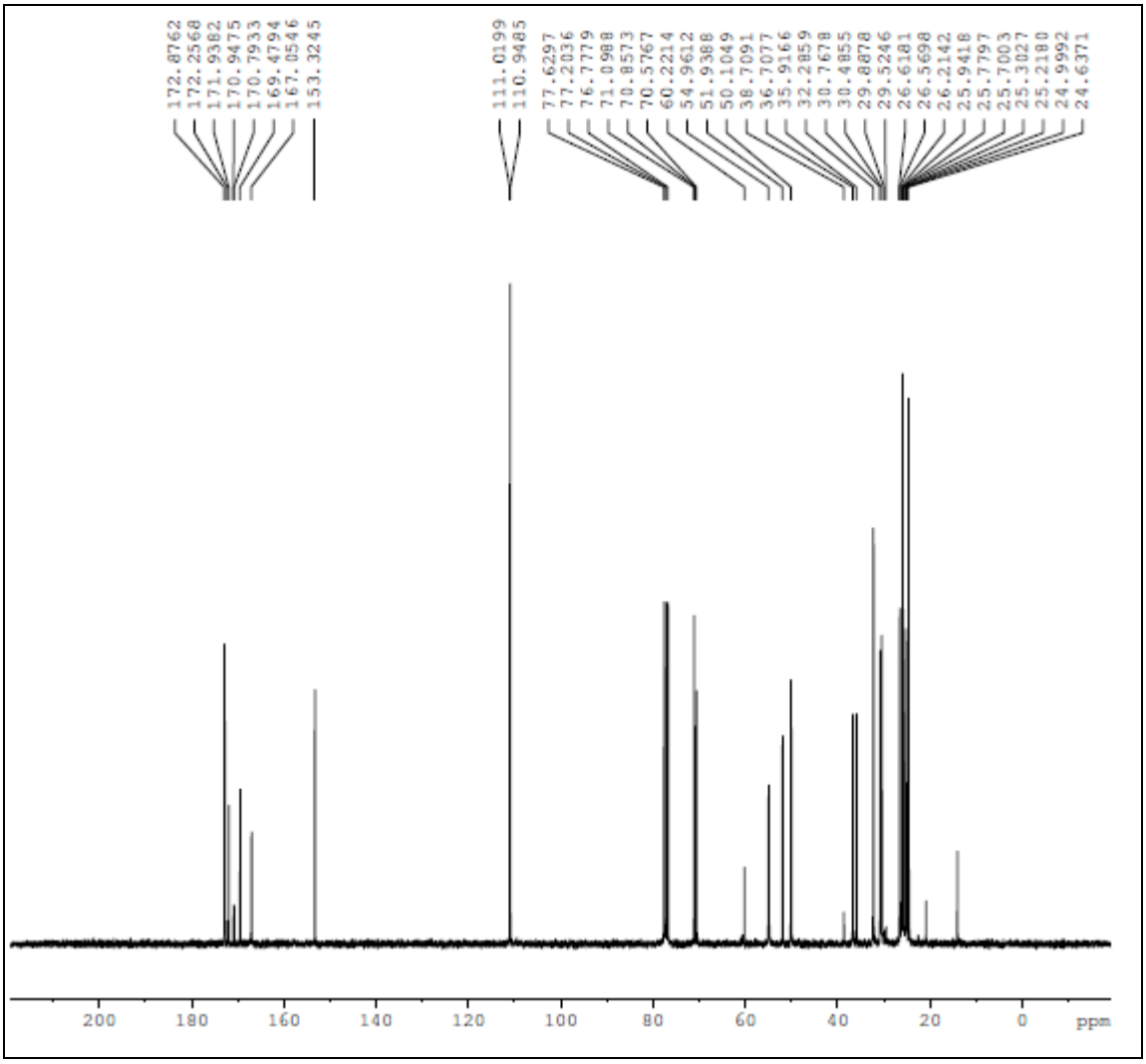
Espectro 9: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, obtidos pelo experimento A5, que utiliza DCC como agente condensante.



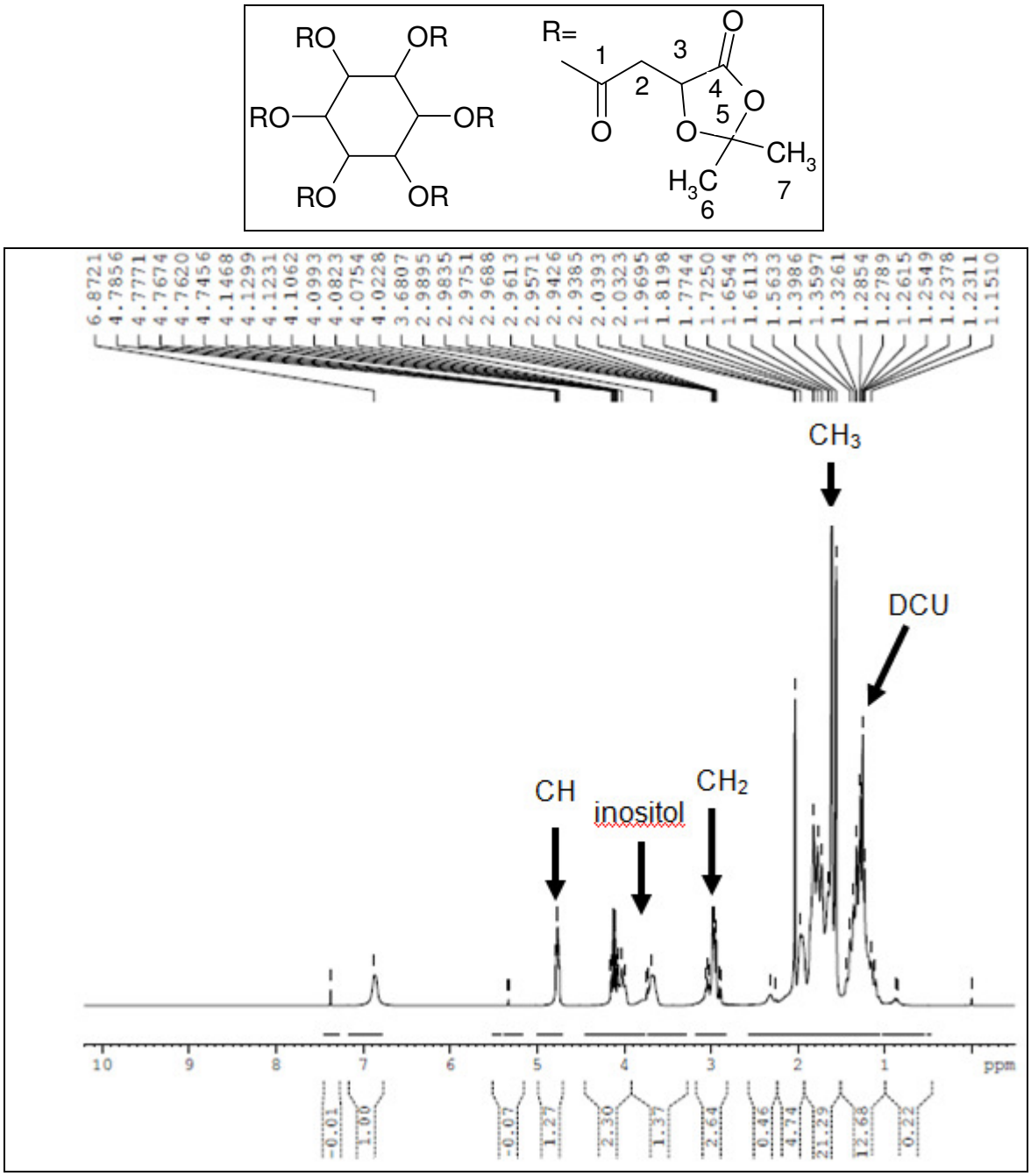


Espectro 10: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, obtidos pelo experimento A5, fração isolada na primeira coluna cromatográfica.





Espectro 11: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do produto da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, obtidos pelo experimento A5, fração isolada na primeira coluna cromatográfica.



Espectro 12: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, obtidos pelo experimento A5, fração isolada na segunda coluna cromatográfica.

4.1.3.1.2 Método B - EDC como agente condensante

Em todos os experimentos realizados pelo método B a proporção molar utilizada entre o álcool e o ácido foi de 1:6, objetivando o maior número de substituições possíveis do ácido málico protegido ao *mio*-inositol.

A princípio, utilizaram-se as condições reacionais descritas no experimento B1, com tempo de reação de 24 horas. Nesta condição foi obtido rendimento bruto de 12%. Com o intuito de aumentar o rendimento desta reação, o seu tempo foi aumentado para 48 horas, como descrito no experimento B2, obtendo-se rendimento bruto de 24%. Desta forma, observou-se que o aumento do tempo de reação é fator importante para o aumento no rendimento. A cromatografia em camada delgada mostrou a formação de duas manchas com R*f* equivalentes a 0,38 e 0,81, valores diferentes dos apresentados pelo material de partida ácido málico protegido. A mancha com valor de R*f* de 0,81 pode estar relacionada à formação do intermediário I desejado, composto com caráter mais apolar. Já a outra mancha está relacionada ao EDU (1-(3-diaminopropil)uréia), subproduto formado pelo uso de EDC nas reações de esterificação. O mecanismo das reações que utilizam EDC, como agentes condensantes é apresentado na Figura 41.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 13) mostrou indícios de obtenção do produto desejado, pois existem sinais que podem ser referentes a H_2 e H_3 do ácido málico próximos a 2,80 ppm, e em 4,67 ppm. A presença dos sinais em 1,61 e 1,65 ppm indica hidrogênios metilênicos presentes na lactona do ácido málico protegido. Além disso, observam-se sinais na região de 3-4 ppm, que podem estar relacionados aos hidrogênios que constituem o anel do inositol. Em adição, o excesso de sinais, possivelmente relacionados ao subproduto EDU, prejudica a interpretação inequívoca do espectro.

O espectro de IV (Espectro 14) do composto obtido apresentou bandas de éster em 1733 cm^{-1}, banda alargada de hidroxila em 3557 cm^{-1}, que pode ser referente às hidroxilas não substituídas do inositol, banda de estiramento de CH alifático, em 2528 cm^{-1}, além de banda em 1418 cm^{-1} relativa à deformação de metilas do ácido málico protegido. Como já discutido, é provável que o composto desejado tenha sido obtido, porém há a banda de amida em 1650 cm^{-1}, provavelmente relacionada ao produto secundário, EDU.

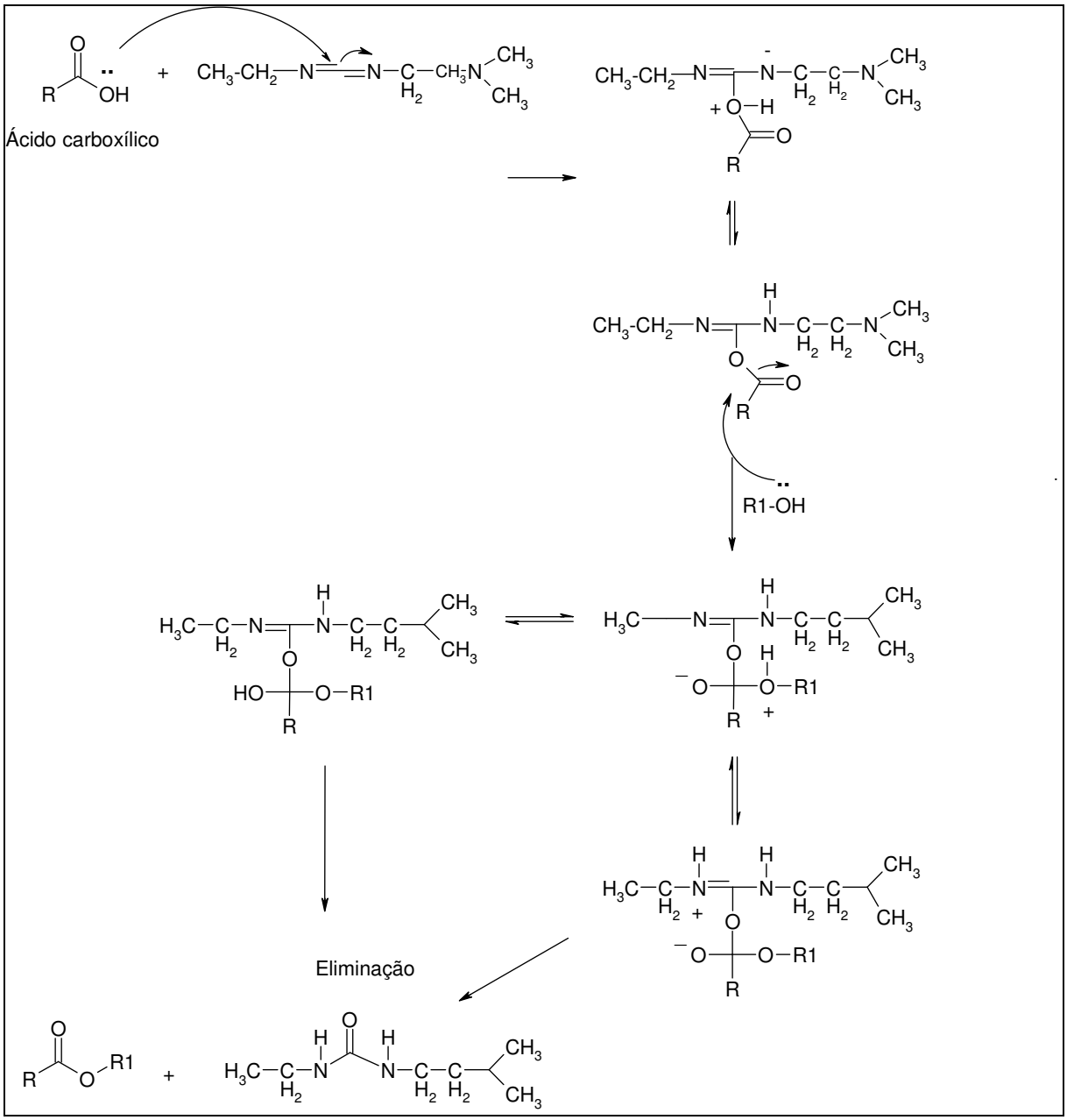
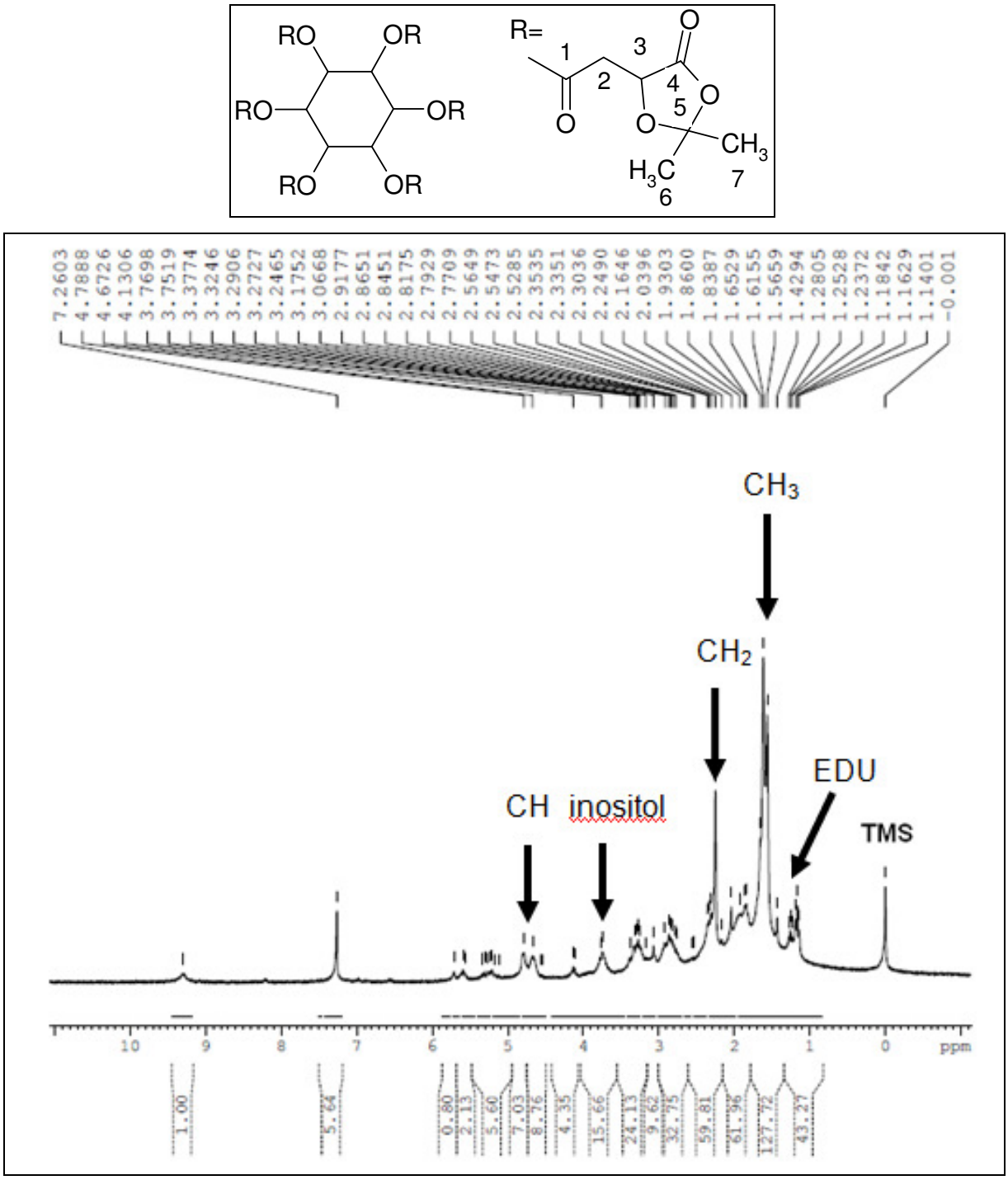
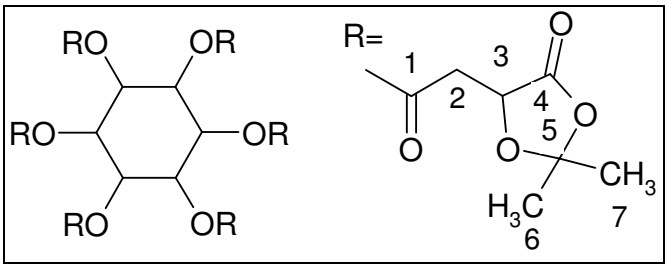
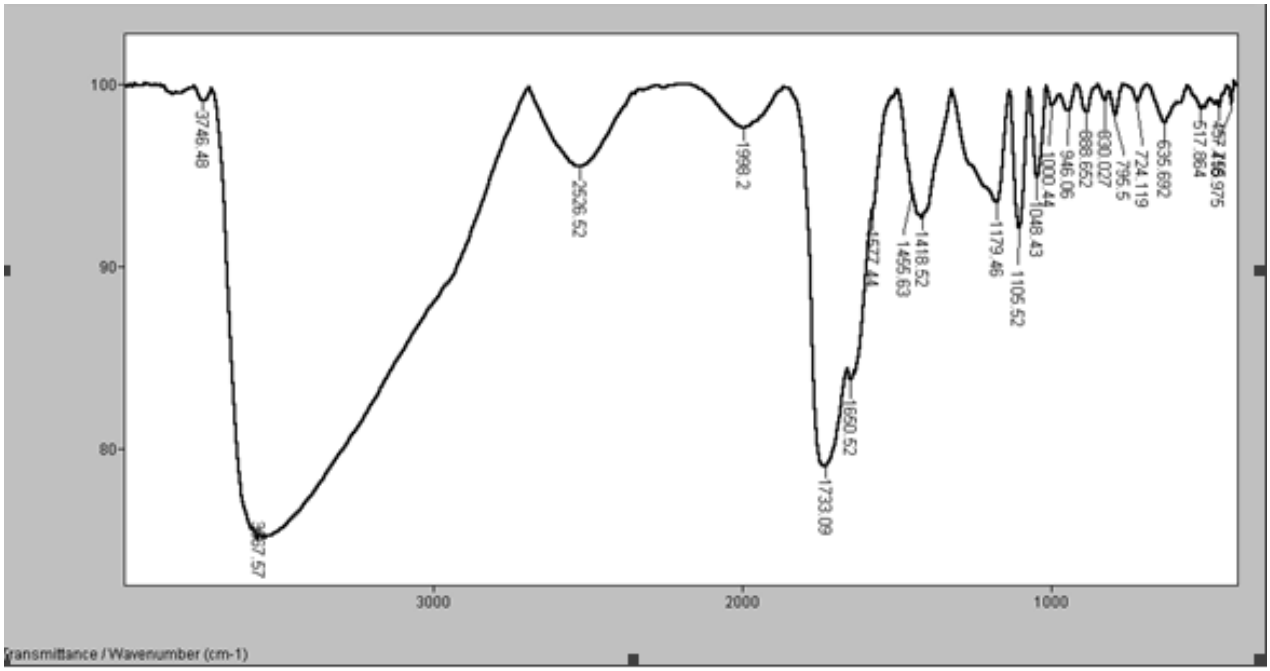


Figura 41: Mecanismo de esterificação com o uso de EDC (GIAROLLA, 2012).



Espectro 13: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, obtido pelo experimento B2, que utiliza EDC como agente condensante.



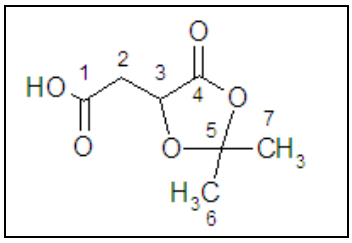


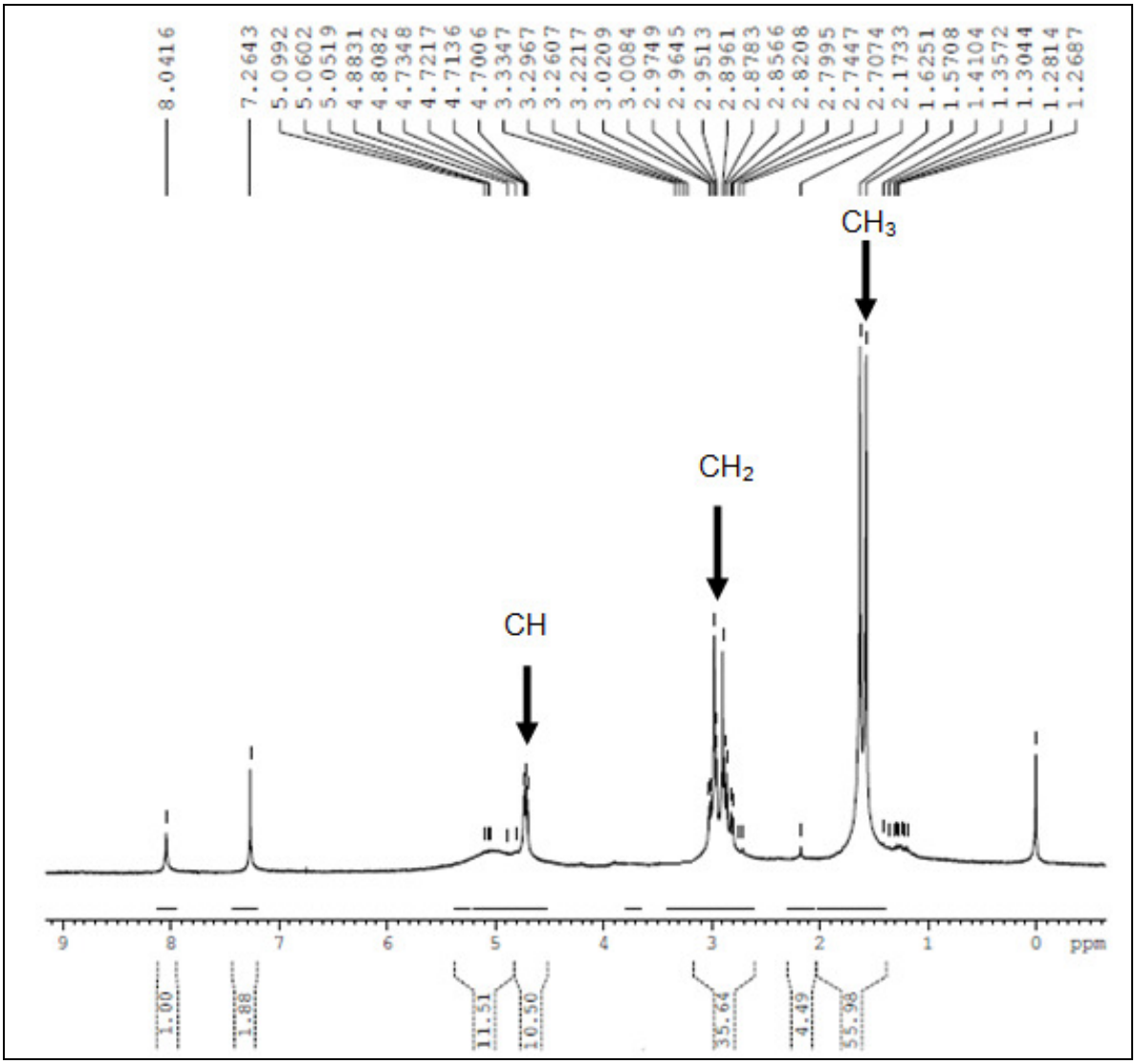
Espectro 14: Espectro no IV do produto impuro da reação entre o ácido málico protegido e o inositol sintetizados pelo experimento B2, que utiliza EDC como agente condensante.

IV (ν, KBr, cm^{-1})
3557 (ν_{OH} álcool); 2528 (ν_{CH} alquilas); 1733 ($\nu_{C=O}$ éster); 1650 ($\nu_{C=O}$ de amida); 1418 (δ_{CH3} angular assimétrica); 1105 (ν_{C-O} álcool); 946 (δ_{OH} álcool); 688 (δ_{CH2} angular assimétrica).

A cromatografia em camada delgada do produto obtido pelo experimento B3 mostrou apenas uma mancha, com aspecto semelhante à mancha do ácido málico protegido, com R*f* de 0,25. Além disso, o espectro de RMN ^1H (Espectro 15) apresentou apenas a presença dos sinais relativos ao ácido málico protegido em 1,57 e 1,62 ppm, e nas regiões de 2,80-3,00 e em 4,70 ppm, referentes aos H_6 e H_7, H_2 e H_3 do ácido málico protegido. Neste espectro não são observados sinais do inositol. Acredita-se que o diclorometano não tenha sido o solvente adequado para

esta reação, o que desfavoreceu a formação do intermediário I. Portanto, o espectro apresenta apenas o ácido málico protegido e, assim, por este experimento o composto desejado não foi obtido.





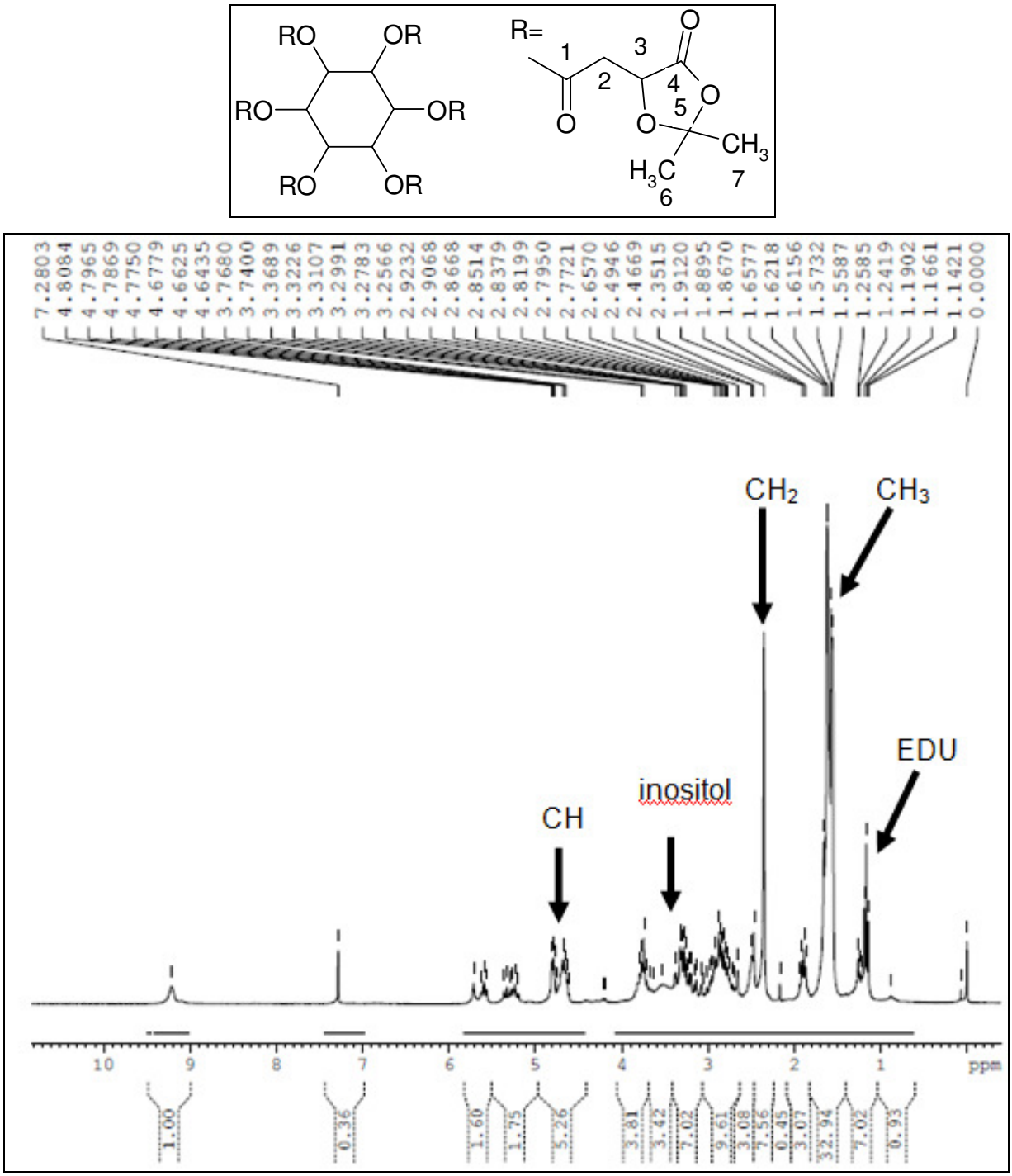
Espectro 15: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, obtido pelo experimento B3, que utiliza EDC como agente condensante.

Para experimento B4, utilizou-se dimetilformamida como solvente para a reação na temperatura de 70 ºC. Esta condição mostrou-se mais adequada para solubilização de todos os reagentes do meio reacional.

A placa cromatográfica do produto obtido pelo experimento B4 mostrou a formação de duas manchas com valores de R*f* equivalentes a 0,39 e 0,78, valores semelhantes aos obtidos pelos experimentos B1 e B2. Acredita-se que a mancha com R*f* de 0,39 seja referente ao EDU, subproduto das reações que utilizam EDC. A mancha com R*f* de 0,78, de caráter mais apolar, estaria vinculada ao intermediário ácido málico protegido-inositol.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 16) deste produto apresentou sinais que podem estar relacionados ao espaçante, como os hidrogênios metilênicos em 1,57 e 1,61 ppm e os hidrogênios dos carbonos 2 e 3 em 2,80 e em 4,70 ppm, respectivamente. Além disso, o espectro mostrou sinais na região de 3,30 e 3,70 ppm, que, provalvelmente, são referentes aos hidrogênios do anel do inositol. Estes sinais indicam a obtenção do intermediário I de interesse. No entanto, no espectro é possível observar excesso de sinais, que podem ser relativos ao EDU formado, subproduto característico nas reações que utilizam EDC, como agente para reações de acoplamento.

Assim como o DCC, o produto formado com EDC apresentou difícil purificação. Então, optou-se pela busca de outra rota sintética para a síntese do intermediário inositol-ácido málico protegido.



Espectro 16: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, obtido pelo experimento B4, que utiliza EDC como agente condensante.

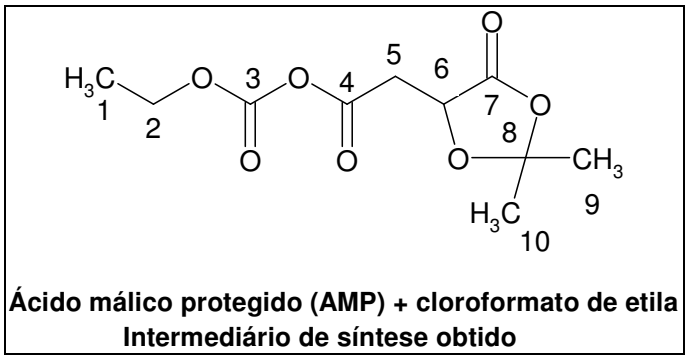
4.1.3.1.3 Método C - método do anidrido misto

Na busca por métodos que resultassem em compostos mais puros, realizou-se a síntese de anidridos mistos com *N*-metilmorfolina (como catalisador) e cloroformatos, tais como cloroformato de etila, de metila e 4-nitrofenilcloroformato, como agentes condensantes.

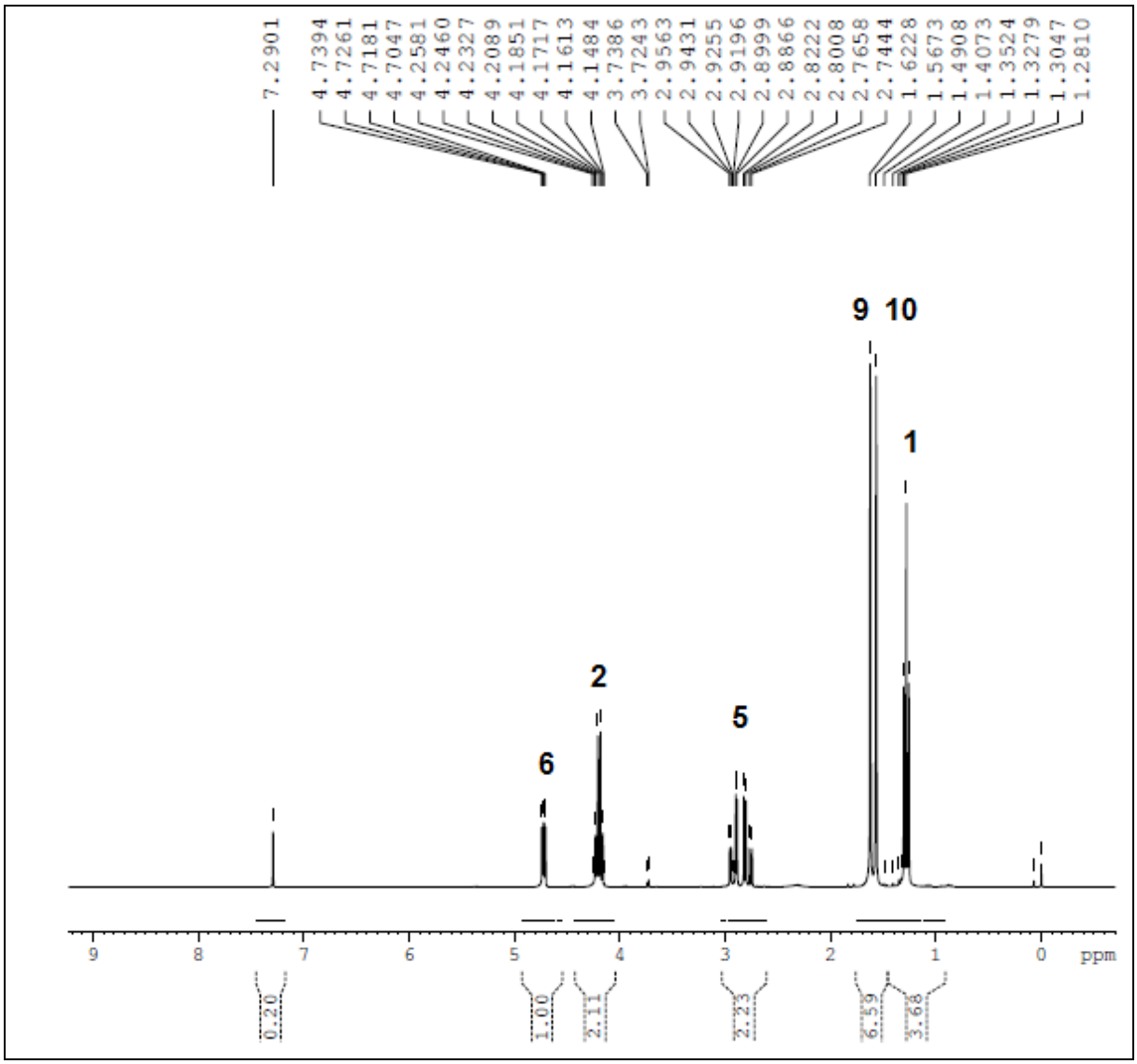
A princípio, foi realizado o experimento C1, em que se utiliza a proporção de 1:6 para ácido málico e *mio*-inositol, devido à possibilidade de ocorrerem seis substituições de ácido málico protegido no anel do inositol. O tempo de reação foi de 24 horas. Após este período, observou-se na cromatografia em camada delgada a formação de mancha com valor de R*f* igual a 0,61, diferente do R*f* observado na obtenção do mesmo intermediário com o uso de outros métodos (R*f* em torno de 0,80, com o uso de DCC e EDC). O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 17) apresentou sinais da presença de ácido málico protegido em 1,56 e 1,62 ppm, referentes aos hidrogênios das metilas da lactona, sinais entre 2,80 e 3,00 ppm relacionados aos hidrogênios do C_2 e multipleto entre 4,70 e 4,73 ppm relativo aos hidrogênios do C_3, porém ausência de sinais de *mio*-inositol. Não se obteve, portanto, o produto desejado.

Nesta reação, há a formação de um intermediário de síntese, o anidrido misto, que deveria ter sofrido ataque nucleofílico pelo *mio*-inositol. Entretanto, a substituição não ocorreu e o que se observa no espectro é a presença deste intermediário sintético. Os sinais entre 1,28 e 1,49 ppm e próximos a 4,20 ppm são, respectivamente, relativos aos hidrogênios de CH_3 e CH_2 (ligado ao oxigênio da função anidrido), que estão presentes neste intermediário de síntese.

Com o objetivo de aumentar a probabilidade de ataque nucleofílico do inositol e avaliar o comportamento desta reação, realizou-se o experimento C2, em que se adicionou inositol na proporção 1:1 em relação ao ácido málico protegido. Porém, com esta modificação o resultado foi análogo ao experimento C1. Então, optou-se pela realização do experimento C3, com proporção 1:1 (álcool/ácido) e aumento no tempo de reação (96 horas). Entretanto, o resultado foi o mesmo obtido nos experimentos anteriores.



Ácido málico protegido (AMP) + cloroformato de etila
Intermediário de síntese obtido



Espectro 17: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) da tentativa de obtenção do intermediário I com o experimento C3, que utiliza cloroformato de etila e *N*-metilmorfolina.

O experimento C5 consiste na utilização de cloroformato de etila, como agente de acoplamento, e trietilamina, como catalisador e aceptor de prótons. A proporção molar utilizada neste experimento foi de 1:1 de ácido málico protegido e *mio*-inositol, seguindo o protocolo utilizado pela referência (KAKWANI *et al.*, 2011) e, também, para tentar favorecer a reação e estabelecer as condições reacionais necessárias para obtenção do éster de interesse.

A cromatografia em camada delgada do experimento C5 mostrou mancha com R*f* igual a 0,61, o mesmo valor apresentado pelo anidrido misto formado entre o ácido málico protegido e cloroformato de etila. Além disso, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 18) deste composto revelou resultado similar aos anteriormente obtidos com os experimentos C1, C2 e C3. Observam-se sinais referentes aos hidrogênios do ácido málico protegido em 1,56 e 1,62 ppm, entre 2,88 e 2,95 ppm e multipleto na região de 4,70 ppm, que são referentes, aos hidrogênios H_6 e H_7, H_2 e H_3, respectivamente do agente espaçante. Além destes, observaram-se sinais entre 1,28 a 1,34 ppm e aqueles próximos de 4,20 ppm, relativos aos hidrogênios de CH_3 e CH_2 presentes no anidrido misto. Portanto, com o uso de cloroformato de etila, não se obteve o intermediário I. O mecanismo desta reação é apresentado na Figura 42.

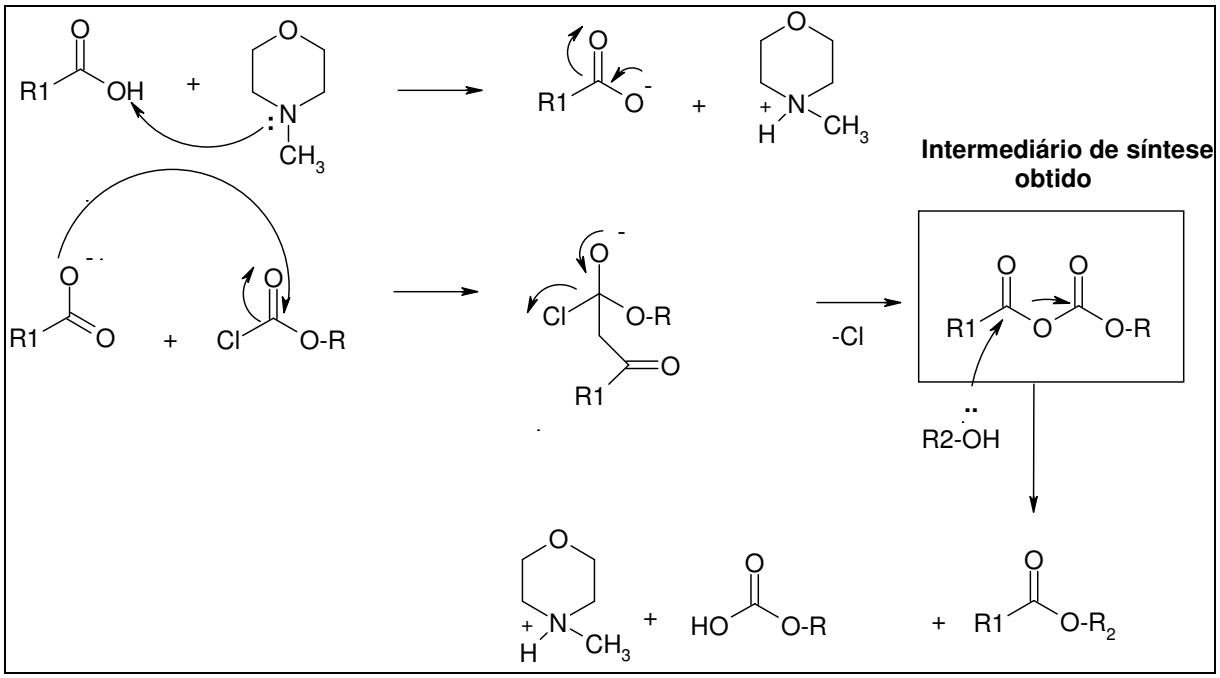
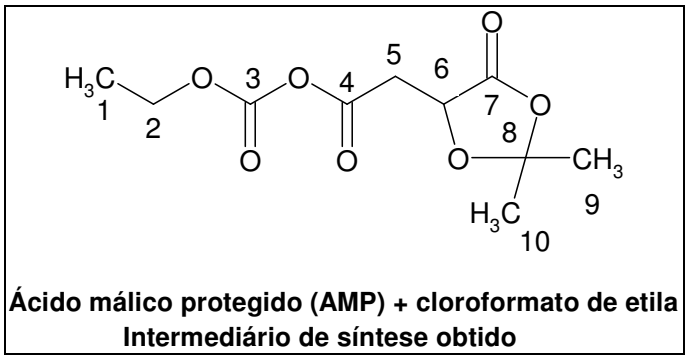
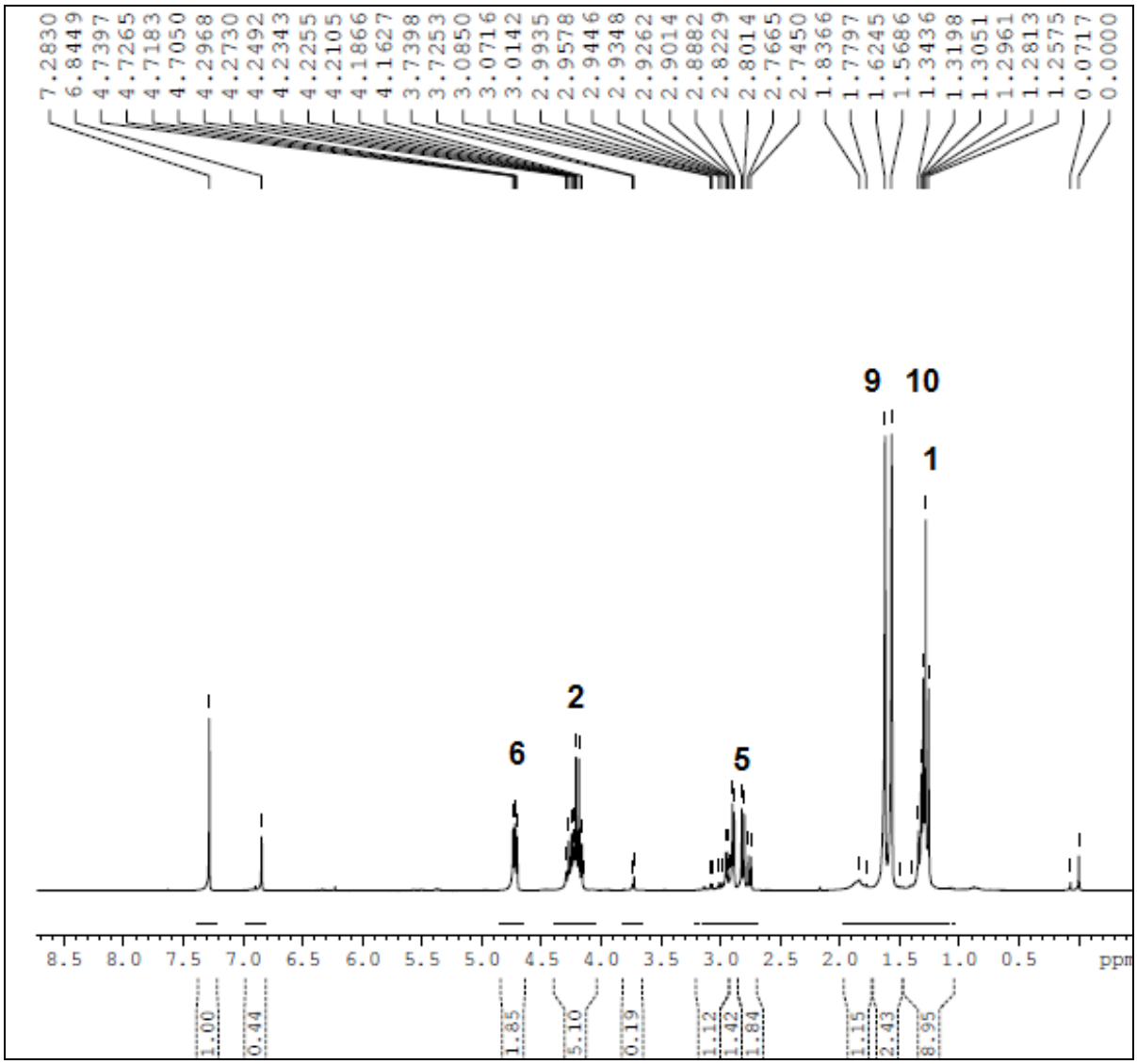


Figura 42: Mecanismo da reação de esterificação utilizando *N*-metilmorfolina e cloroformato (GIAROLLA, 2012).



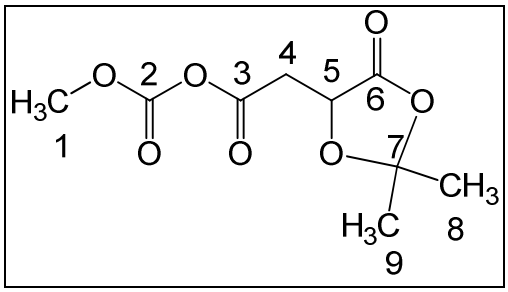
Ácido málico protegido (AMP) + cloroformato de etila
Intermediário de síntese obtido

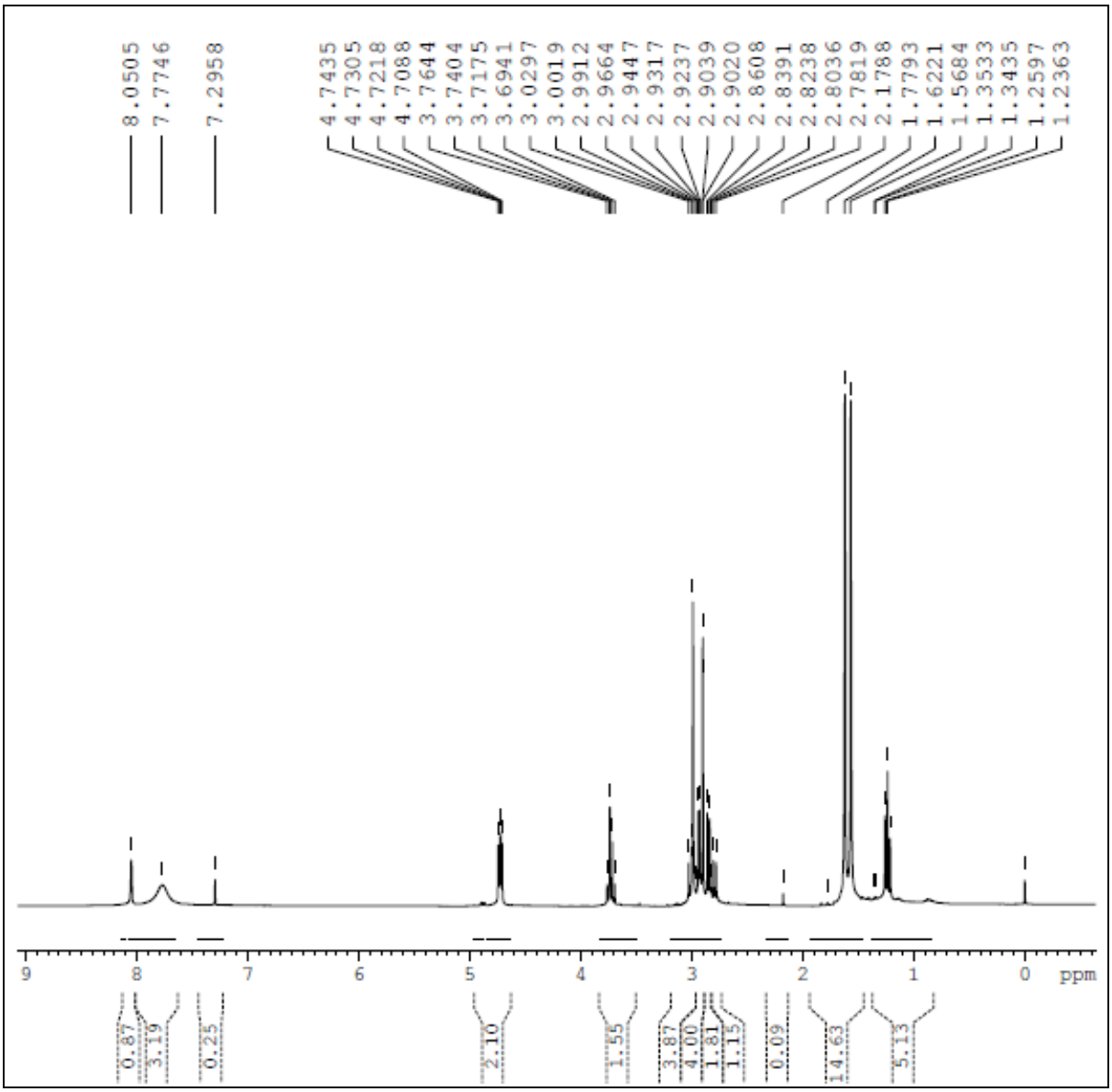


Espectro 18: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) da tentativa de obtenção do intermediário I com o experimento C5, que utiliza cloroformato de etila e trietilamina.

Outro experimento realizado com o uso de cloroformato foi o C6, que consistiu na utilização de cloroformato de metila (agente condensante) e trietilamina (catalisador) e, também, com a proporção molar álcool/ácido de 1:1. Após 26 horas de reação, a placa cromatográfica deste composto mostrou duas manchas, que apresentaram valores de R*f* equivalentes a 0,23 e 0,55. A mancha com menor valor revela a presença de material de partida que não reagiu (ácido málico protegido). A outra mancha com R*f* de 0,55 mostrou caráter mais polar do que as manchas obtidas nos métodos que utilizam DCC e EDC.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 19) do composto obtido com o experimento C6 mostrou, novamente, a formação de anidrido misto entre o ácido málico protegido e cloroformato de metila, sem o prosseguimento da reação No espectro, é possível observar sinais relacionados ao ácido málico protegido em 1,56 e 1,62 ppm, correspondentes aos hidrogênios das metilas do espaçante, bem como os hidrogênios H_2 e H_3 nas regiões de 2,80 e 4,70 ppm, respectivamente. Além disso, é possível observar sinal em 3,70 ppm relativo aos hidrogênios do grupo metoxila, proveniente do cloroformato de metila. Portanto, não se obteve o intermediário I de interesse. A nucleofilicidade das hidroxilas do inositol, provavelmente, não foi suficiente para o ataque à carbonila do anidrido misto que apresentou grande estabilidade.





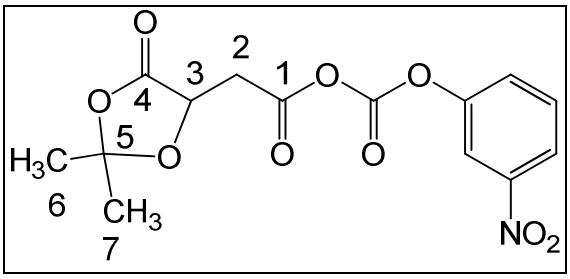
Espectro 19: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) da tentativa de obtenção do intermediário I com o experimento C6, que utiliza cloroformato de metila e trietilamina.

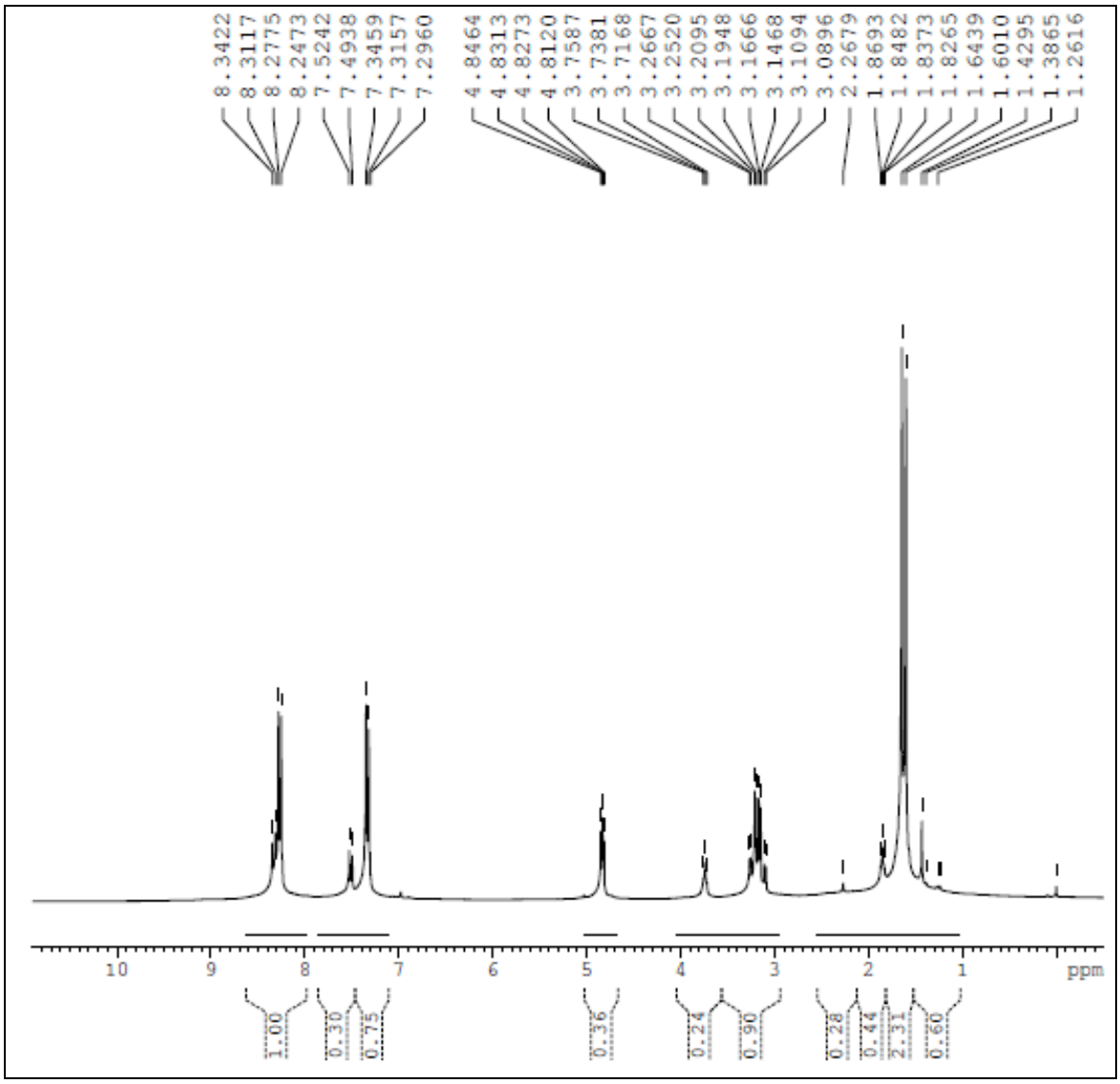
O experimento C4 consistiu no uso de 4-nitrofenilcloroformato, como agente condensante, e *N*-metilmorfolina, como catalisador. O 4-nitrofenilcloroformato foi utilizado com o intuito de aumentar a eletrofilicidade do anidrido formado, pois o grupo nitrofenila pode atuar como melhor grupo de saída que os grupos etila ou metila (derivados obtidos com cloroformato de etila ou metila, respectivamente) e, desta forma, favorecer o ataque nucleofílico do inositol. A proporção molar utilizada foi de 1:6 de álcool/ácido.

Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada do composto obtido pelo experimento C4 mostrou duas manchas com valores de R*f* iguais a 0,46 e 0,61, diferentes do material de partida, ácido málico protegido.

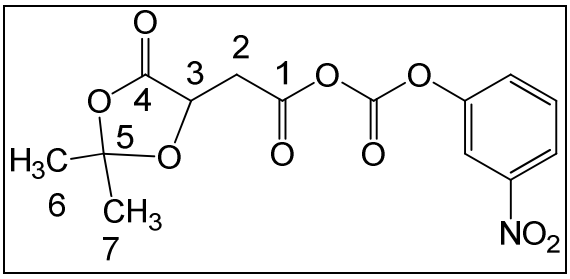
Entretanto, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 20) mostrou a presença de outro anidrido misto formado entre o ácido málico protegido e o 4-nitrofenilcloroformato. Como já mencionado, este anidrido faz parte do mecanismo de reação com este agente condensante e deveria ter sofrido ataque nucleofílico do inositol. No espectro é possível observar a presença dos sinais relativos aos hidrogênios do espaçante, em 1,60 e 1,64 ppm, sinais em campo mais baixo, mas característicos do ácido málico protegido na região de 3,10-3,20 ppm, e em 4,80 ppm, referentes aos hidrogênios dos carbonos 6 e 7, 2 e 3, respectivamente. Além disso, o espectro apresenta sinais que revelam a formação deste intermediário entre 7 e 8 ppm, corresppondentes ao anel nitrado do agente condensante.

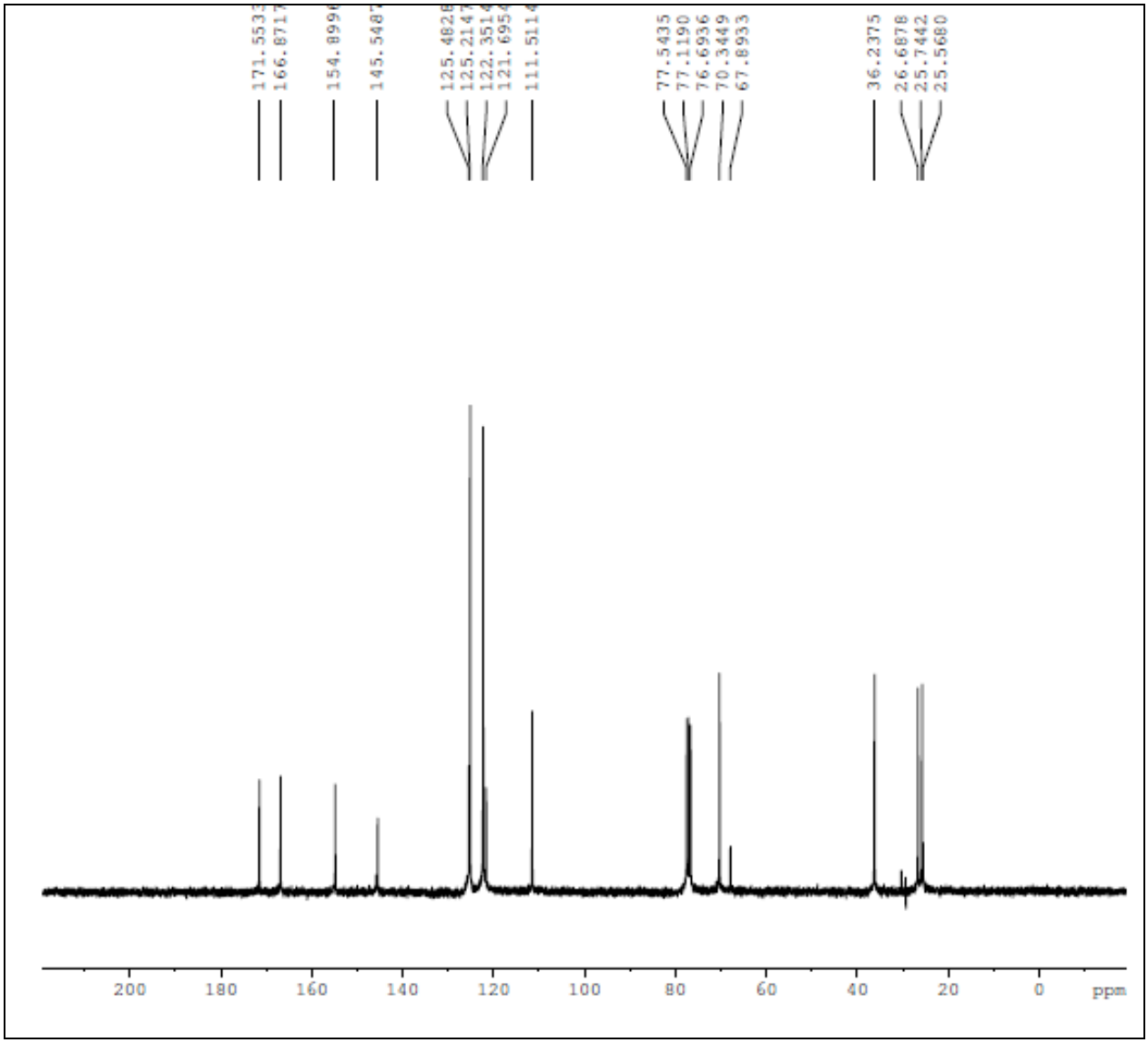
Outra evidência de obtenção deste anidrido misto foi o espectro de RMN ^{13}C (Espectro 21), que apresentou sinais na região de 121,69 e 125,48 ppm, que correspondem aos carbonos do anel aromático nitrado. Além disso, o sinal em 154,89 ppm é referente ao carbono do anel ligado ao oxigênio, bem como o sinal em 145,54 ppm está relacionado à carbonila do anidrido. Em adição, o espectro de RMN de ^{13}C revelou os sinais relativos aos carbonos do ácido málico protegido na região de 25 ppm (C_6 e C_7), em 36,23 ppm (C_3), 70,34 ppm (C_2), 111,51 ppm (C_5), em 71,55 ppm que corresponde a carbonila da lactona, e principalmente o sinal em 166,87 ppm, referente à carbonila ligada ao anidrido (C_1). Portanto, estes resultados mostram que os experimentos que utilizam cloroformato não foram eficientes para a síntese do intermediário formado entre inositol e ácido málico protegido.





Espectro 20: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) da tentativa de obtenção do intermediário I com o experimento C4, que utiliza 4-nitrofenilcloroformato e *N*-metilmorfolina.





Espectro 21: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) da tentativa de obtenção do intermediário I com o experimento C4, que utiliza 4-nitrofenilcloroformato e *N*-metilmorfolina.

4.1.3.1.4 Método D - CDI como agente condensante

Devido à dificuldade de purificação dos compostos sintetizados com DCC e EDC e a não obtenção do intermediário I com a utilização de cloroformatos, optou-se pela busca de outra metodologia para síntese destes compostos, com menos problemas na purificação. Desta forma, utilizou-se CDI, como agente condensante para as reações de esterificação.

Para o experimento D1, a cromatografia mostrou duas manchas com valor de R*f* equivalente a 0,24 e 0,86. A mancha com R*f* de 0,86 poderia estar relacionada com a obtenção do intermediário I. Entretanto, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 9) mostrou a presença de sinais referentes ao ácido málico protegido livre, como os singletos em 1,56 e 1,61 ppm, sinais entre 2,76 e 2,95 ppm e entre 4,74 e 4,78 ppm, relacionados, respectivamente, aos hidrogênios das metilas presentes na lactona, H_2 e H_3, o que indica a presença do material de partida. Em adição, o espectro mostrou sinais de um intermediário sintético formado nas reações que utilizam CDI, devido à presença de sinais entre 7,11 e 8,18 ppm, relativos aos hidrogênios do anel imidazólico deste intermediário de síntese. Além disso, apareceram sinais dos hidrogênios do ácido málico protegido ligado ao anel imidazólico deslocados para campo mais baixo, em 1,65 ppm, entre 3,27 e 3,57 ppm, entre 4,74 e 4,92 ppm, relacionados, respectivamente, aos hidrogênios metilênicos da lactona, H_2 e H_3 do ácido málico protegido ligado ao imidazol. Os sinais referentes aos inositol estão ausentes neste espectro, portanto, o intermediário I de interesse não foi obtido por este experimento.

Nesta reação (Figura 43) há a formação de um intermediário sintético, que deveria ter sofrido ataque nucleofílico pelo *mio*-inositol. Entretanto, a substituição não ocorreu e o que se observa no espectro é mistura de ácido málico protegido livre e deste intermediário de síntese formado pelo ácido málico protegido e anel imidazólico (Espectro 22).

Com o intuito de aumentar a probabilidade de ataque nucleofílico do inositol e avaliar o comportamento desta reação, realizaram-se os experimentos D2 e D3. O experimento D2 consiste no aumento da proporção molar de inositol para 1:1 em relação ao ácido málico protegido. Além disso, as condições reacionais foram alteradas, utilizando-se dimetilformamida, melhor solvente para os reagentes desta reação com temperatura de 70 ^{o}C, durante 3 horas, seguindo o protocolo da

referência (BODE *et al.*, 2010). Entretanto, o resultado foi semelhante ao obtido pelo experimento D1. Então, optou-se pela realização do experimento D3, que, também, consiste na alteração da proporção molar para 1:1 (álcool/ácido), uso de dimetilformamida como solvente, aumento da temperatura para 80 ºC e do tempo de reação para 24 horas, conforme o protocolo da referência (HUSSAIN, LIEBERT, HEINZE, 2004). No entanto, o resultado foi o análogo ao obtido pelos experimentos D1 e D2.

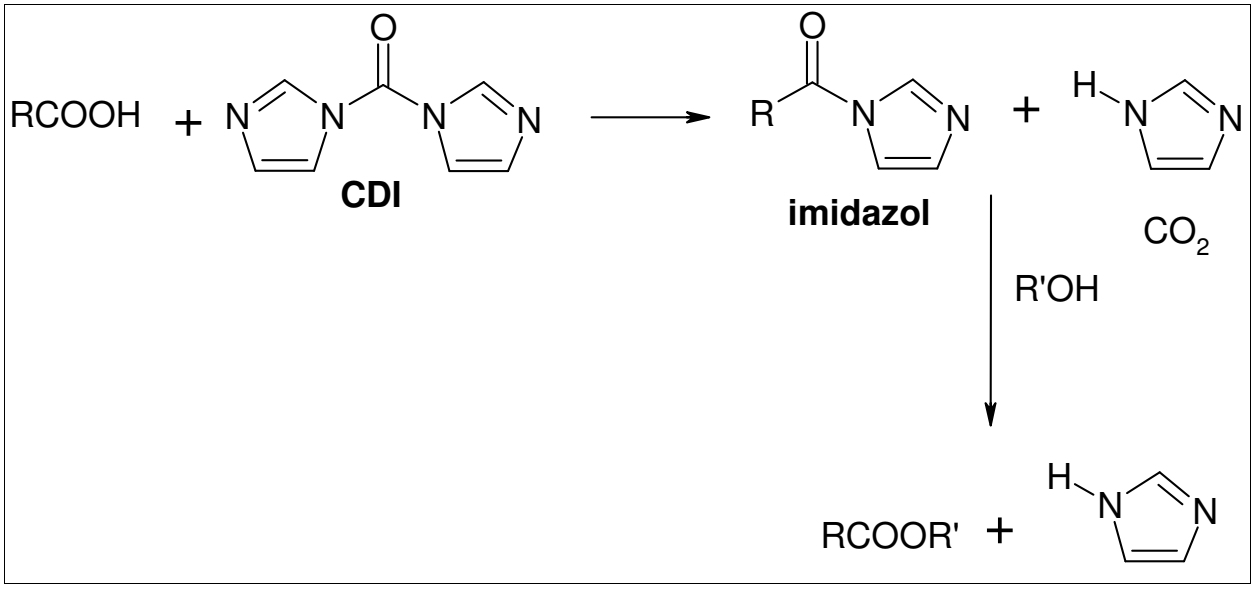
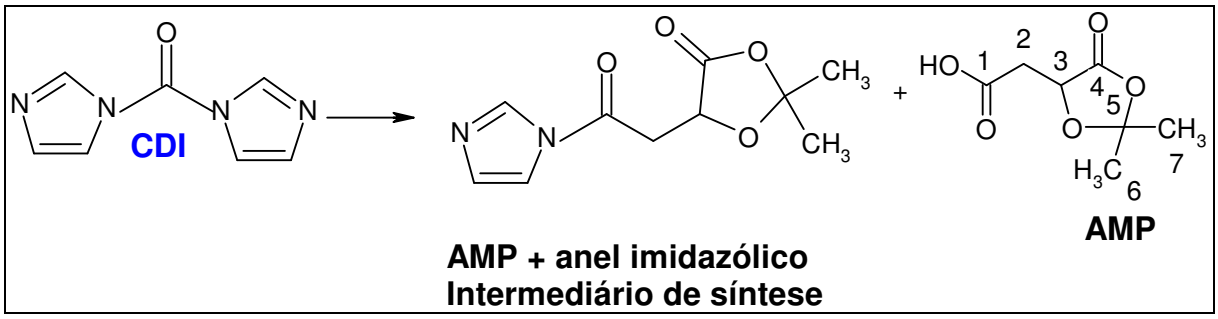
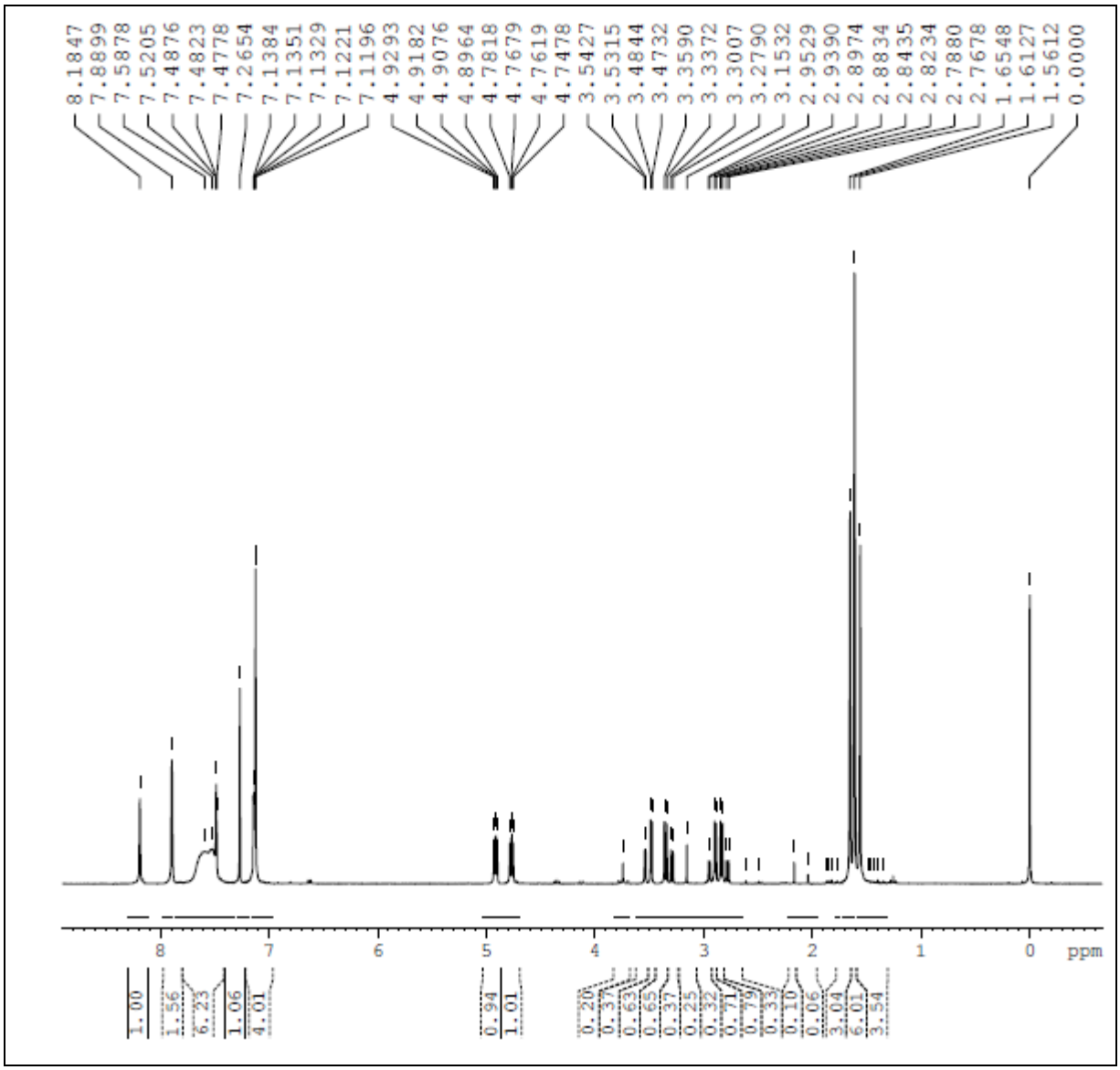


Figura 43: Mecanismo da reação de esterificação utilizando com CDI, como agente condensante (CHRISTIE, 1993).





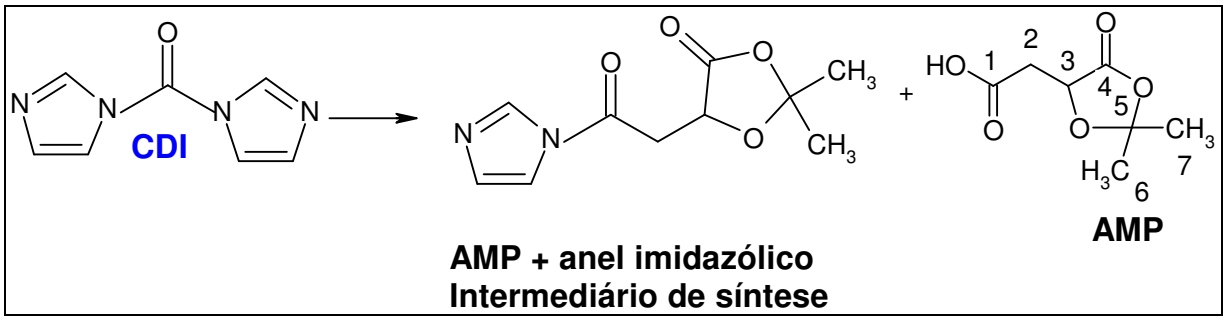
Espectro 22: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido obtido com o experimento D1, que utiliza CDI como agente condensante.

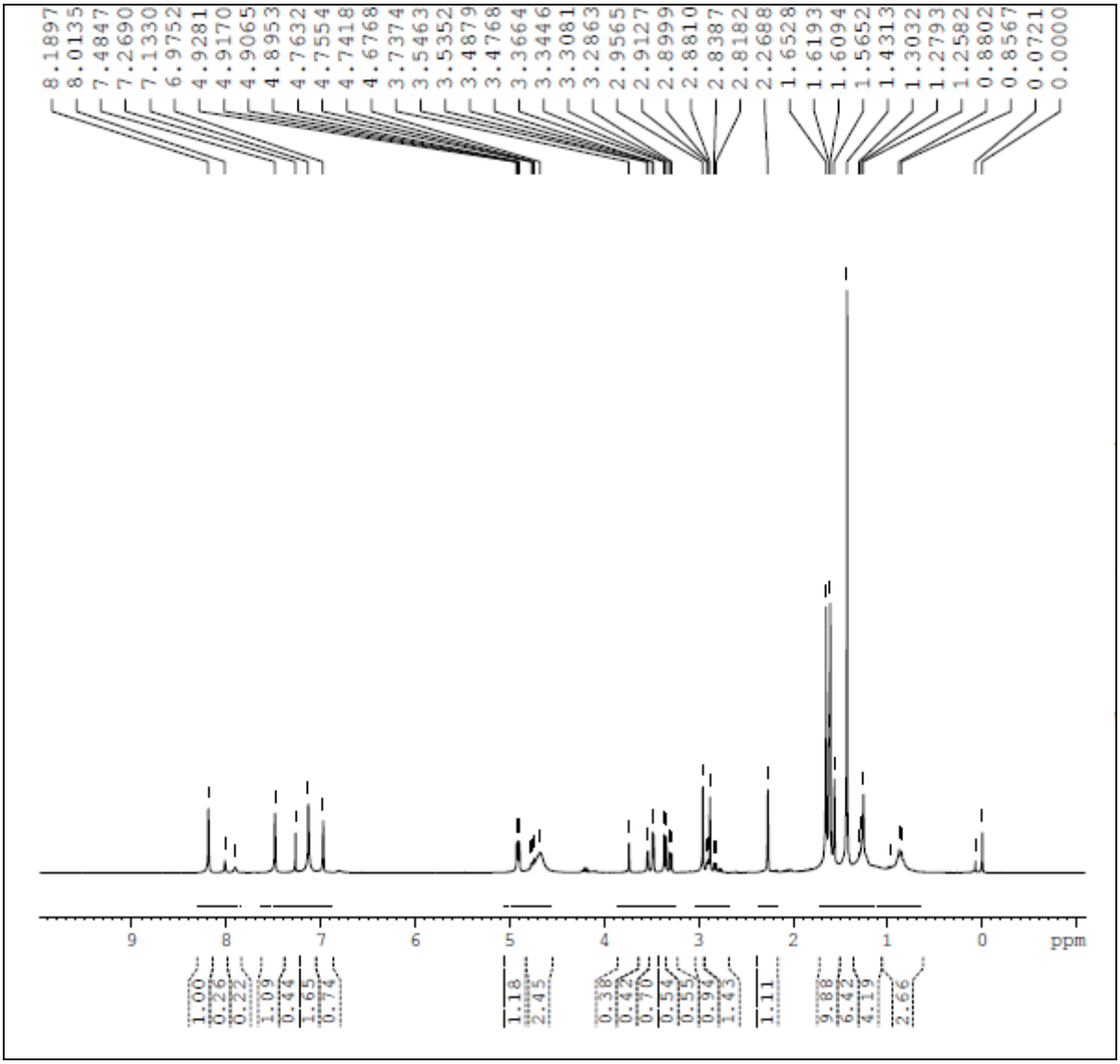
Para forçar a substituição, realizou-se o experimento D4, que utilizou a proporção molar de inositol para ácido málico protegido de 2,5:1, em dimetilformamida, por 16 horas, seguindo o protocolo realizado por Tukulula (2009). O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 23) do produto obtido por esse experimento não apresentou resultado satisfatório. No espectro, novamente, estão ausentes os sinais do inositol. Observam-se os sinais característicos do espaçante em 1,56 e 1,60 ppm, entre 2,80 e 3,00 ppm, e em 4,70 ppm, que correspondem, respectivamente, aos hidrogênios H_6 e H_7, H_2 e H_3 do ácido málico protegido. Além disso, observam-se os sinais referentes ao intermediário sintético na região de 7,00 e 8,00 ppm, relativos ao imidazol, bem como sinais do ácido málico protegido ligado ao imidazol, deslocados para campo mais baixo. Portanto, novamente, obteve-se mistura de ácido málico protegido que não reagiu e o intermediário de síntese CDI-AMP.

Outra tentativa para favorecer o ataque nucleofílico foi o experimento D5, que consistiu na síntese do intermediário formado pelo CDI e ácido málico protegido e no isolamento deste composto. Posteriormente, este intermediário foi adicionado a meio reacional contendo a proporção molar de 1:1,5 de intermediário para o inositol, respectivamente. Além disso, o tempo reacional foi aumentado para 4 dias, a reação foi realizada de acordo com o protocolo adotado por Jong *et al.*, em 2001.

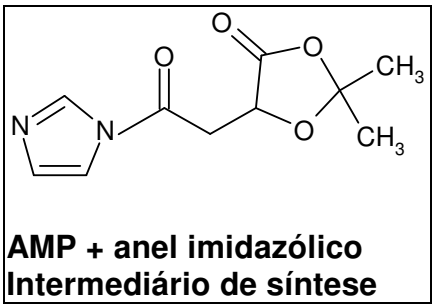
Após 4 dias de reação, a cromatografia em camada delgada mostrou mancha com R*f* de 0,83, valor semelhante ao que corresponde ao intermediário de síntese. Além disso, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 24) deste composto apresentou a presença de sinais do ácido málico protegido em 1,62 e 1,57 ppm referentes aos hidrogênios metilênicos da lactona, bem como outros sinais característicos entre 2,80 e 3,00 ppm, e em 4,70 ppm, que correspondem, respectivamente, aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 do espaçante. Em adição, são observados sinais na região entre 7,00 e 8,00 ppm relativos aos hidrogênios do anel imidazólico e os sinais do inositol estão ausentes. Portanto, com este experimento foi obtido apenas o intermediário sintético formado entre o ácido málico protegido e o CDI.

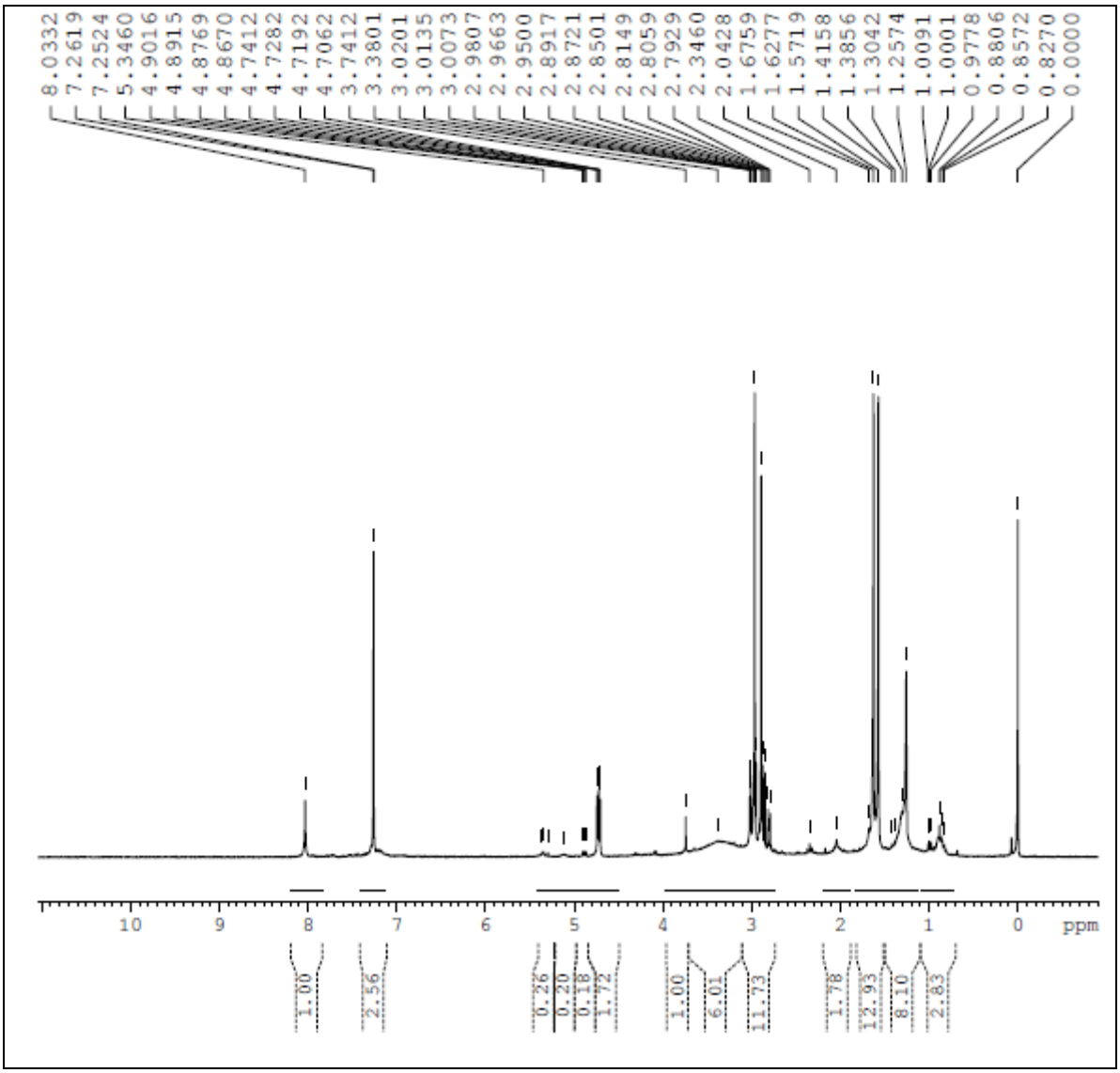
Dessa forma, experimentos que empregam CDI (D1 a D5) como agente de acoplamento não foram eficientes para a obtenção do intermediário I de interesse. Obteve-se o intermediário de síntese, que não reagiu com o *mio*-inositol. Dessa forma, buscaram-se outros métodos para esterificação do ácido málico protegido ao *mio*-inositol.





Espectro 23: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido obtidos pelo experimento D4, que utiliza CDI, como agente condensante.





Espectro 24: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido obtidos pelo experimento D5, que utiliza CDI, como agente condensante.

4.1.3.1.5 Método E – Esterificação de Fisher

Outra tentativa sintética realizada para obtenção do intermediário I foi a esterificação de Fisher. Este método consiste no uso de ácido sulfúrico para catalisar a reação de esterificação (Figura 44).

No experimento E1 utilizou-se a proporção molar de 1:1 (ácido málico protegido e *mio*-inositol), solução de ácido sulfúrico a 20%, com solvente tetraidrofurano em temperatura ambiente por 3 horas, conforme protocolo descrito por Santos (2005).

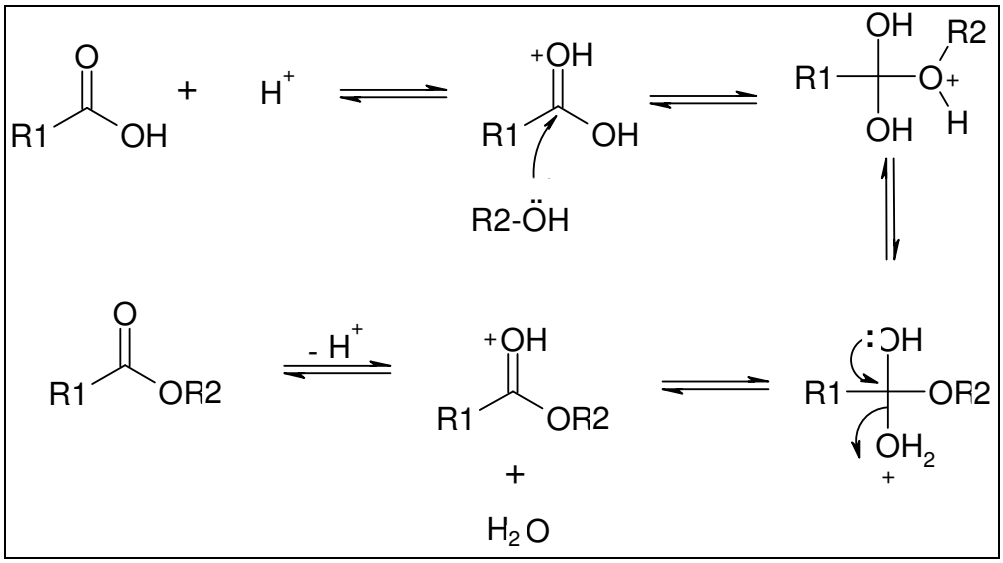
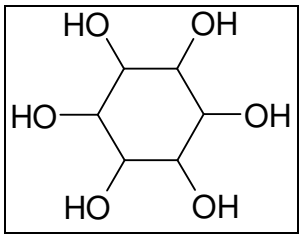


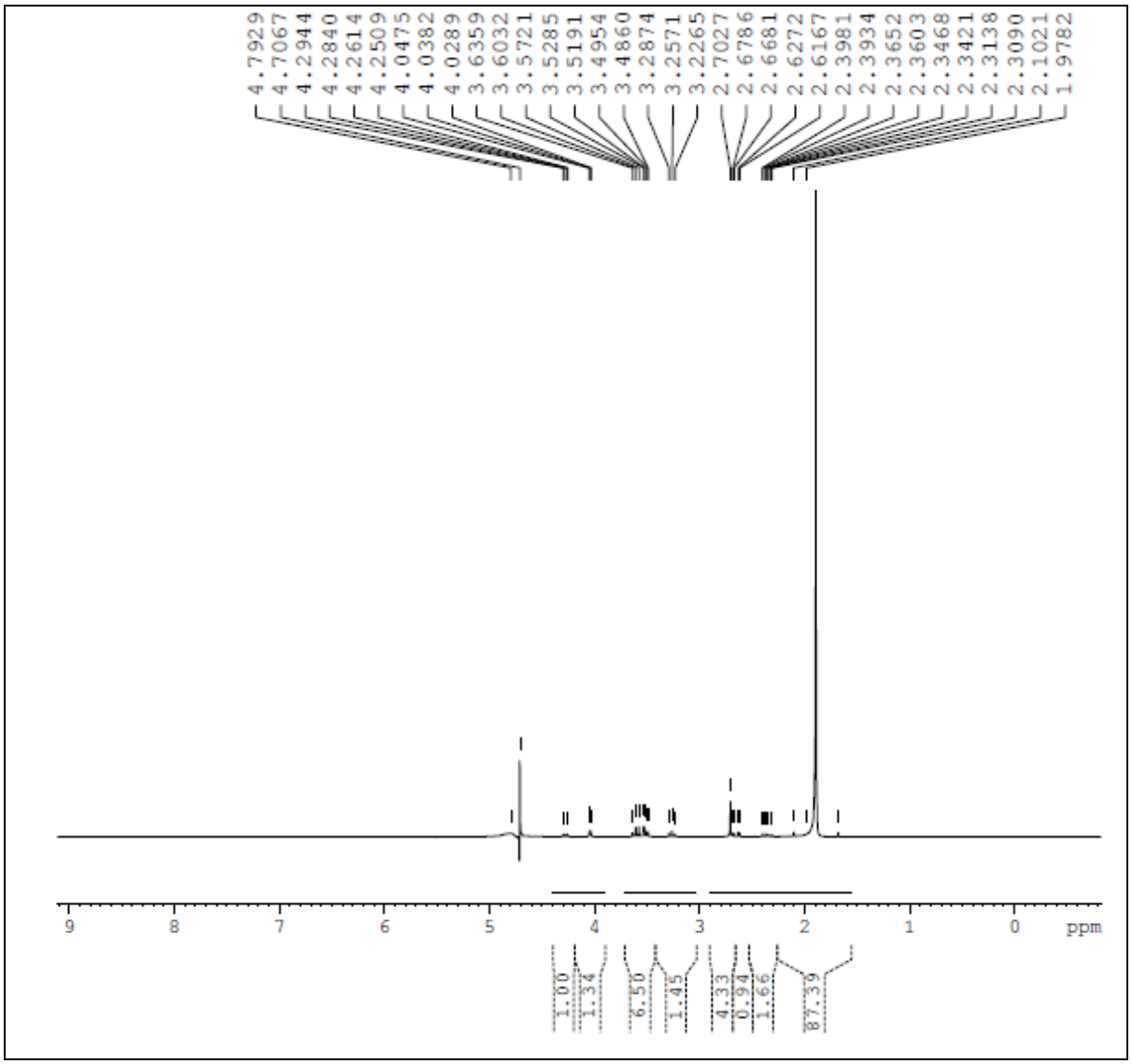
Figura 44: Mecanismo da reação de esterificação de Fisher (ALLINGER *et al.*, 1976).

.

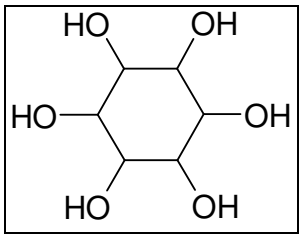
Durante a reação do experimento E1 observaram-se problemas com relação à solubilização dos reagentes, com a formação de precipitado branco no meio reacional, semelhante ao *mio*-inositol, que provavelmente não reagiu. A placa cromatográfica da fase orgânica desta reação não apresentou manchas que indicassem a obtenção do produto de interesse. Devido a estes indícios, optou-se pela liofilização da porção aquosa obtida da extração e o seu espectro de RMN ^{1}H (Espectro 25) mostrou sinais na região de 3 e 4 ppm, o que caracteriza a presença de *mio*-inositol que não reagiu, e portanto, foi para a porção aquosa. Além disso, observa-se sinal evidente em 2,00 ppm relacionado ao ácido sulfúrico utilizado como catalisador da reação. Portanto, não se considerou esse experimento eficiente para obtenção do intermediário ácido málico protegido e inositol.

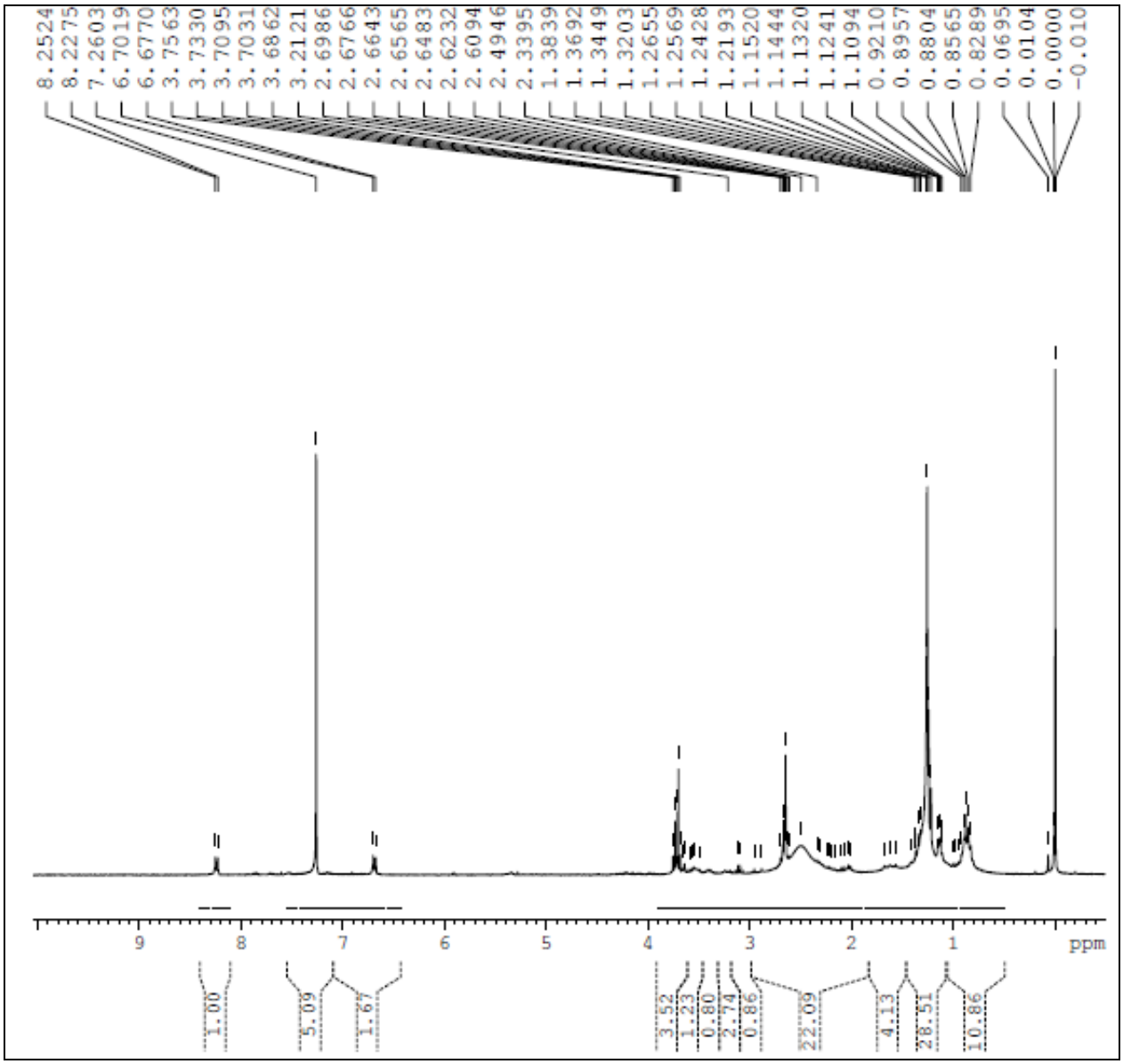
Com o objetivo de favorecer o ataque nucleofílico do inositol e avaliar o comportamento desta reação, realizou-se o experimento E2. Neste utilizou-se dimetilformamida, que se mostrou mais adequada para este meio reacional, temperatura de 70 ºC e maior tempo (27 horas). No entanto, a placa cromatográfica mostrou manchas que indicassem a obtenção de um novo composto. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 26) apresentou apenas sinais de solventes utilizados para síntese e extração do material. Os sinais em 1,26 ppm relacionados ao solvente acetato de etila utilizado na extração, bem como os sinais na região de 2,60, e em 8,00 ppm podem ser referentes à dimetilformamida. Os sinais na região de 3 e 4 ppm podem estar relacionados ao *mio*-inositol que não reagiu. Além disso, o excesso de sinais dificultou a interpretação do espectro, não sendo possível observar com clareza os sinais correspondentes ao intermediário desejado. Portanto, esse método foi inconclusivo.





Espectro 25: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, D_2O) da porção liofilizada da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, realizado com o experimento E1, esterificação de Fisher.





Espectro 26: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, realizado com o experimento E2, esterificação de Fisher.

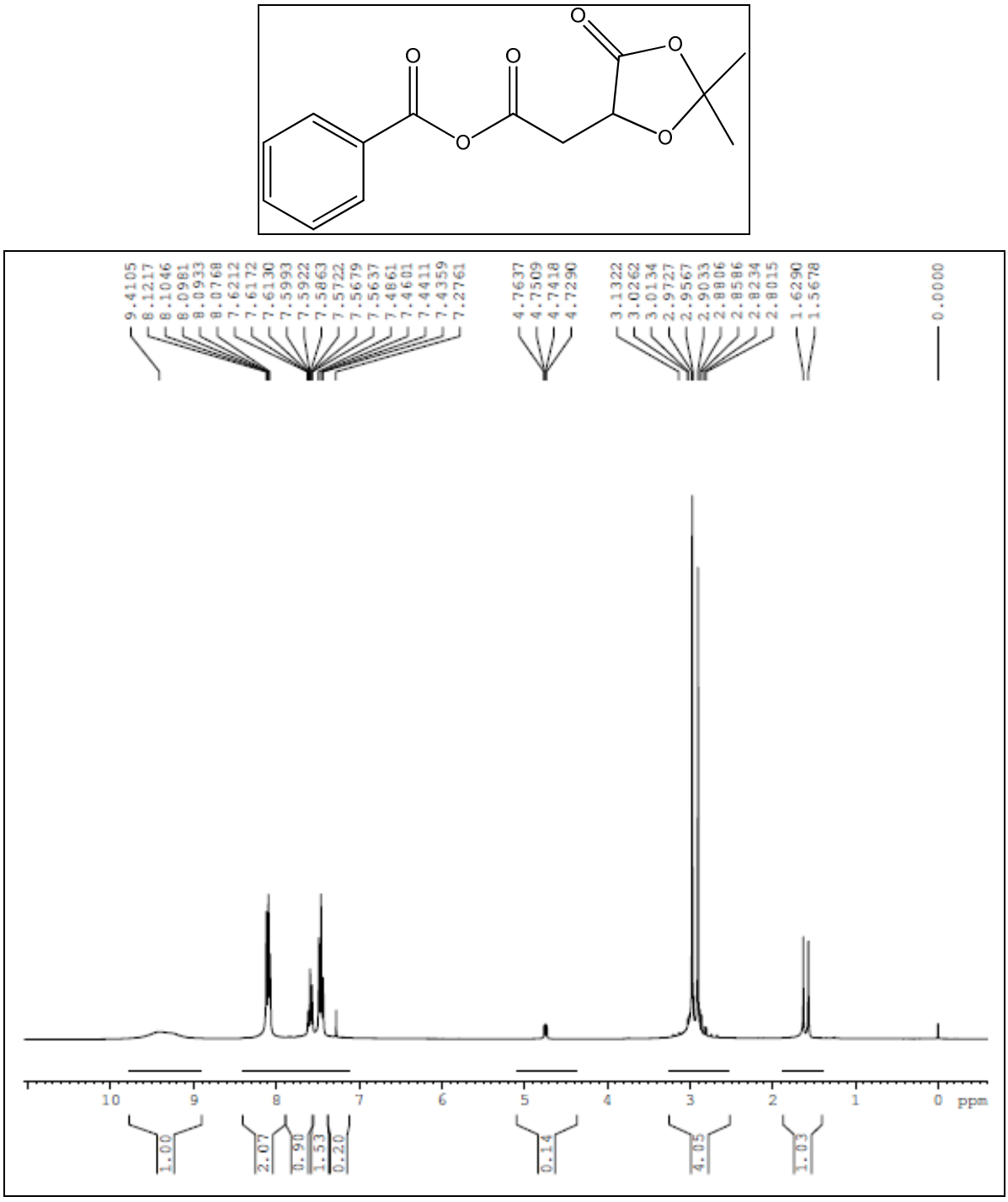
4.1.3.1.6 Método F- cloreto de acila para esterificação

Diante das dificuldades encontradas para obtenção do intermediário, buscaram-se métodos alternativos de esterificação. Os experimentos seguindo o método F utilizaram cloreto de acila para a reação de acoplamento entre o ácido málico protegido e *mio*-inositol. Os cloretos de ácido são muito utilizados na síntese de ésteres.

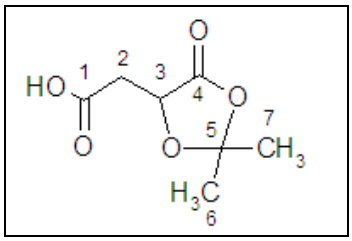
Para o experimento F1 utilizou-se cloreto de benzoíla, na proporção molar de 1:6 (álcool/ácido). Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada apresentou mancha com de R*f* 0,71, o que mostra a obtenção de um composto com caráter mais apolar.

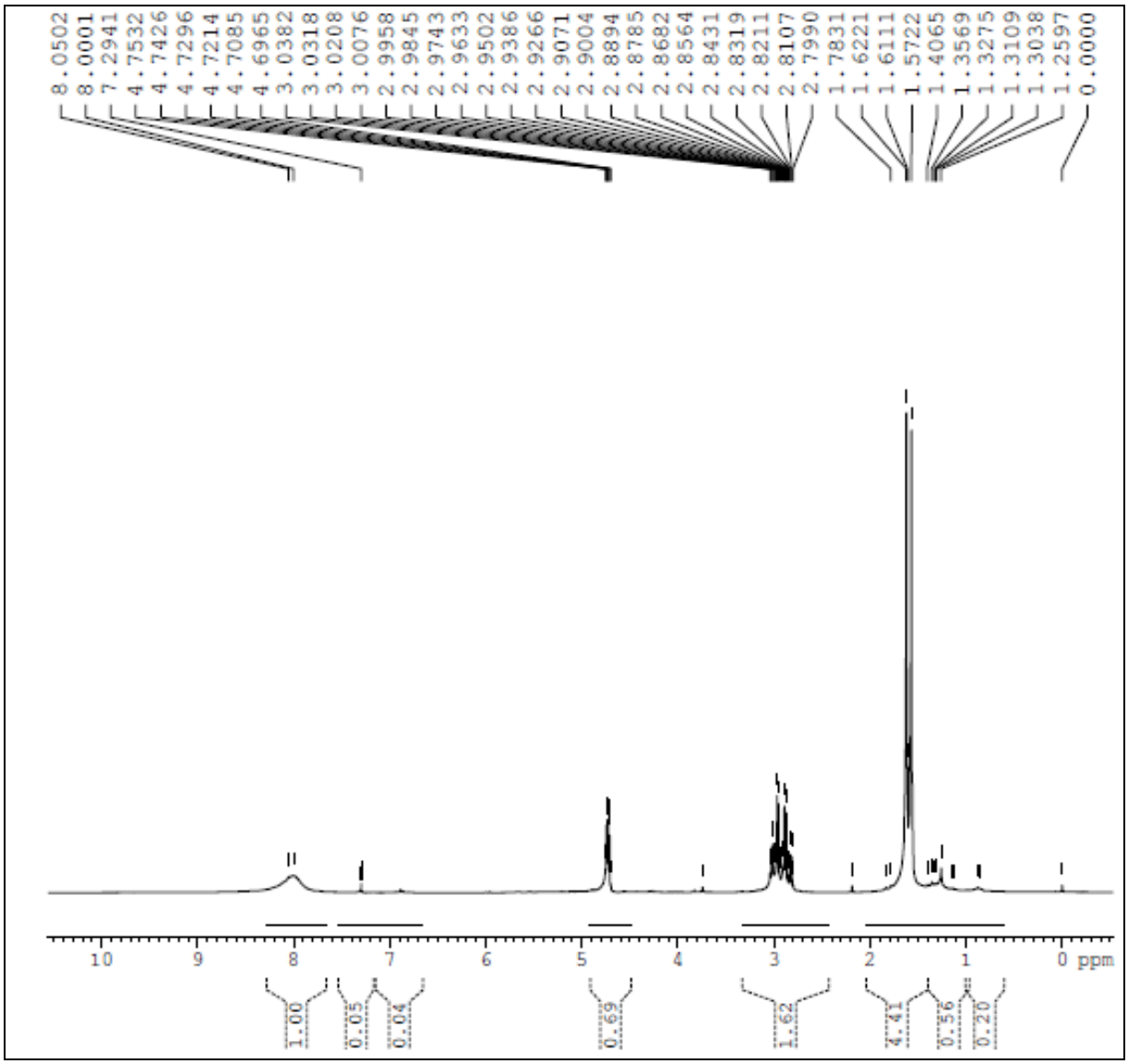
Entretanto, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 27) mostrou a formação do intermediário de síntese obtido nesta reação, formado entre o ácido málico protegido e o anel benzílico do cloreto de benzoíla. No espectro, observam-se sinais referentes ao ácido málico protegido, como os singletos em 1,56 e 1,62 ppm, que correspondem aos hidrogênios das metilas da lactona do AMP. Além disso, são observados os sinais entre 2,80 e 3,13 ppm e, também, na região de 4,70 ppm, relacionados, respectivamente, aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 do agente espaçante. Em adição, no espectro é possível observar sinais entre 7 e 8 ppm, relativos aos hidrogênios do anel benzílico. Neste espectro, os sinais do inositol não estão presentes. Portanto, com esta metodologia o intermediário I não foi sintetizado.

O experimento F2 consiste no uso de cloreto de oxalila, como agente condensante. As placas cromatográficas do composto obtido mostraram apenas a formação de mancha com R*f* de 0,26, valor muito próximo apresentado pelo ácido málico protegido, o que indica que o espaçante não reagiu com o inositol, para a formação do intermediário I de interesse. Além disso, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 28) mostrou apenas a presença de ácido málico protegido, pois são observados os sinais característicos em 1,57 e 1,62 ppm, em 2,80 e 3,00 ppm, além dos sinais na região de 4,70 ppm, que correspondem aos hidrogênios H_6 e H_7, H_2 e H_3 do espaçante. Ademais, este espectro não apresentou sinais do *mio*-inositol. Dessa forma, o experimento F2 também não se mostrou eficiente para a obtenção do intermediário inositol-ácido málico protegido.



Espectro 27: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, realizada pelo experimento F1, utilizando cloreto de benzoíla.





Espectro 28: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, realizada pelo experimento F2, utilizando cloreto de oxalila.

Outro experimento com base no método F foi o F3, que empregou o cloreto de tionila (Figura 45). Após 22 horas de reação, a cromatografia em camada delgada do produto obtido mostrou mancha com R*f* de 0,78, o que indica a obtenção de composto com caráter mais apolar.

O RMN ^{1}H (Espectro 29) desta reação apresentou sinais do ácido málico protegido em 1,56 e 1,62 ppm, sinais na região de 2,80 e 3,00 ppm e em 4,70 ppm referentes aos hidrogênios dos carbonos 6 e 7, 2 e 3 do ácido málico protegido, respectivamente. Além disso, neste espectro há sinais na região entre 3,00 e 4,00 ppm, que podem estar relacionados aos hidrogênios do anel do inositol, o que dá indícios de formação do intermediário I desejado. Portanto, esta metodologia deve ser avaliada com mais cuidado para a obtenção do intermediário ácido málico protegido e inositol, tão importante para a síntese de dendrímeros. As reações com cloretos de acila, utilizando cloreto de tionila podem representar boa alternativa para essa síntese.

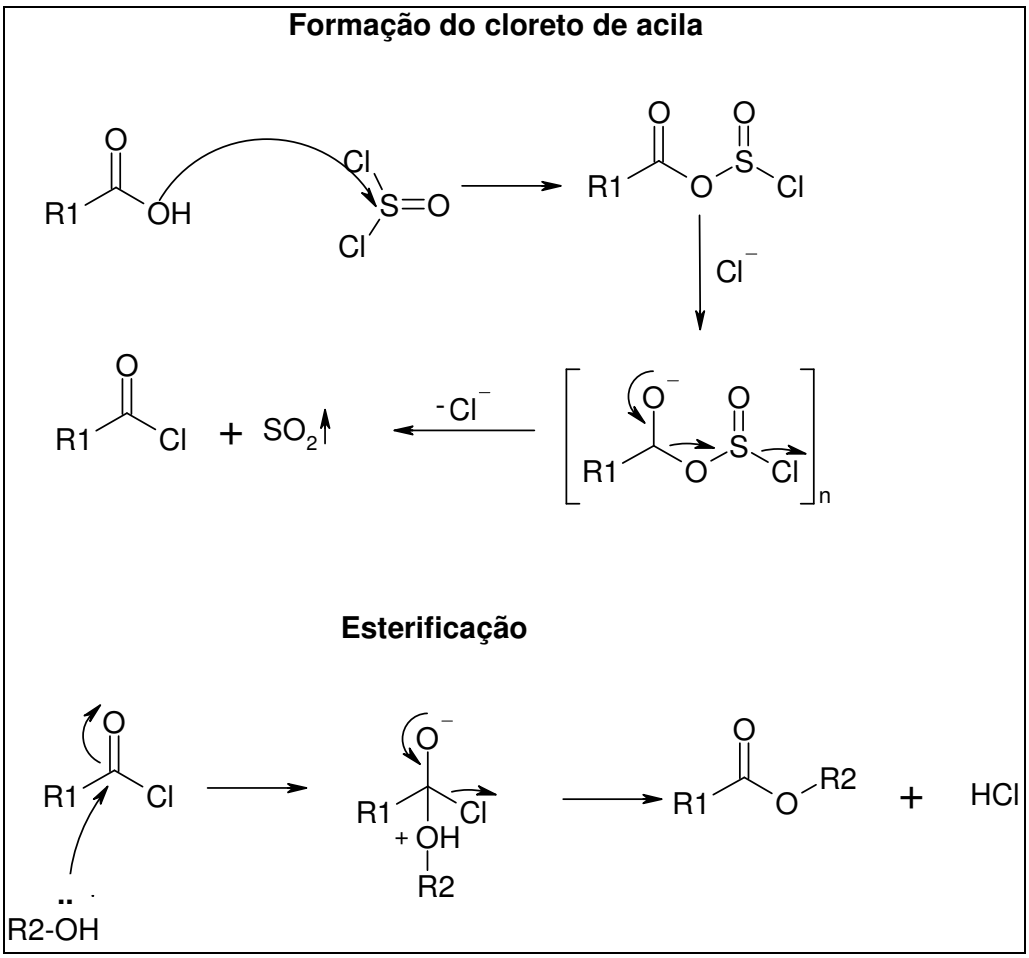
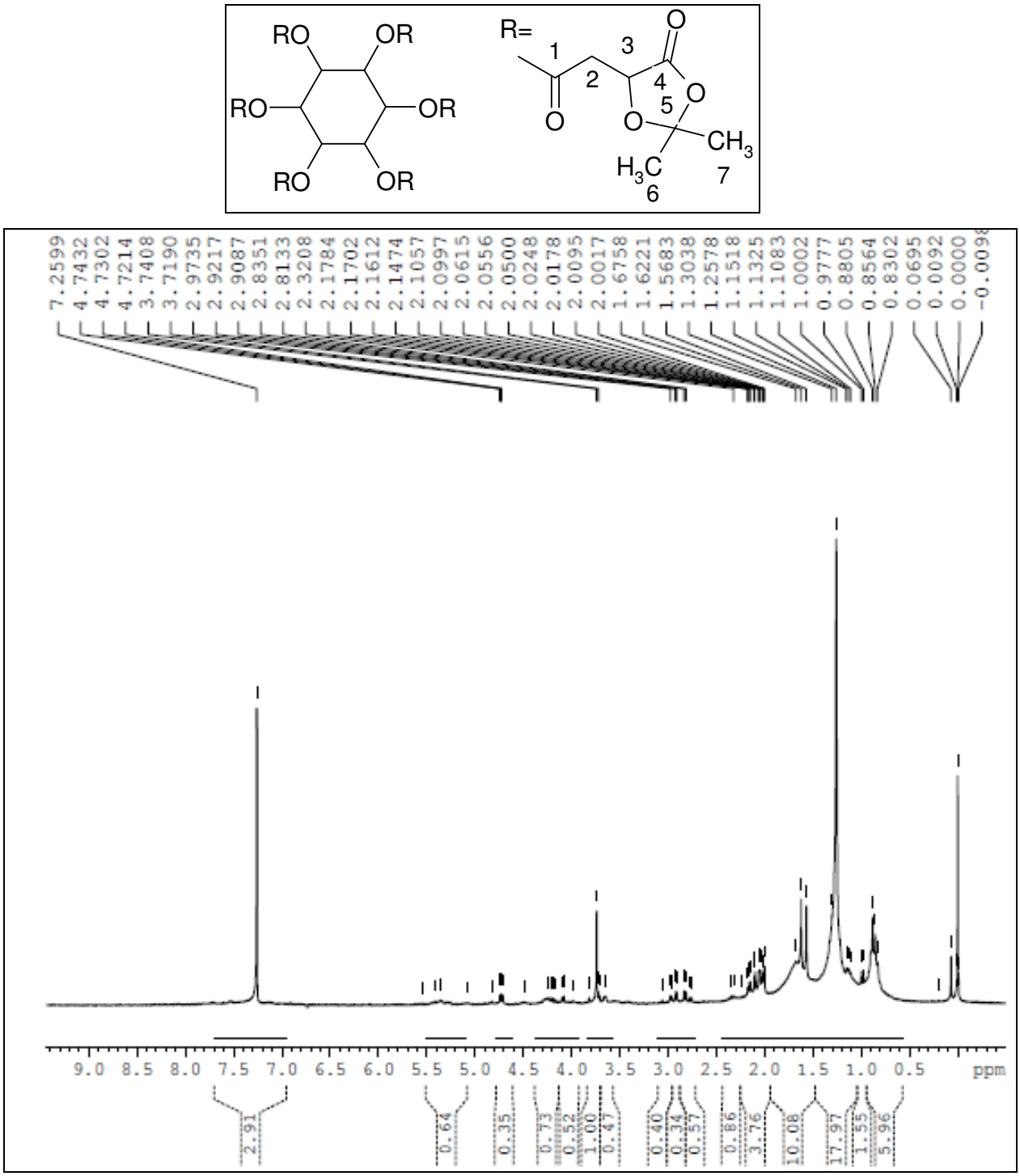


Figura 45: Mecanismo da reação de esterificação utilizando cloreto de acila (ALLINGER *et al.*, 1976).



Espectro 29: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) da reação entre *mio*-inositol e ácido málico protegido, realizada pelo experimento F3, utilizando cloreto de tionila.

4.1.3.2 Síntese do malato de inositol (Figura34)

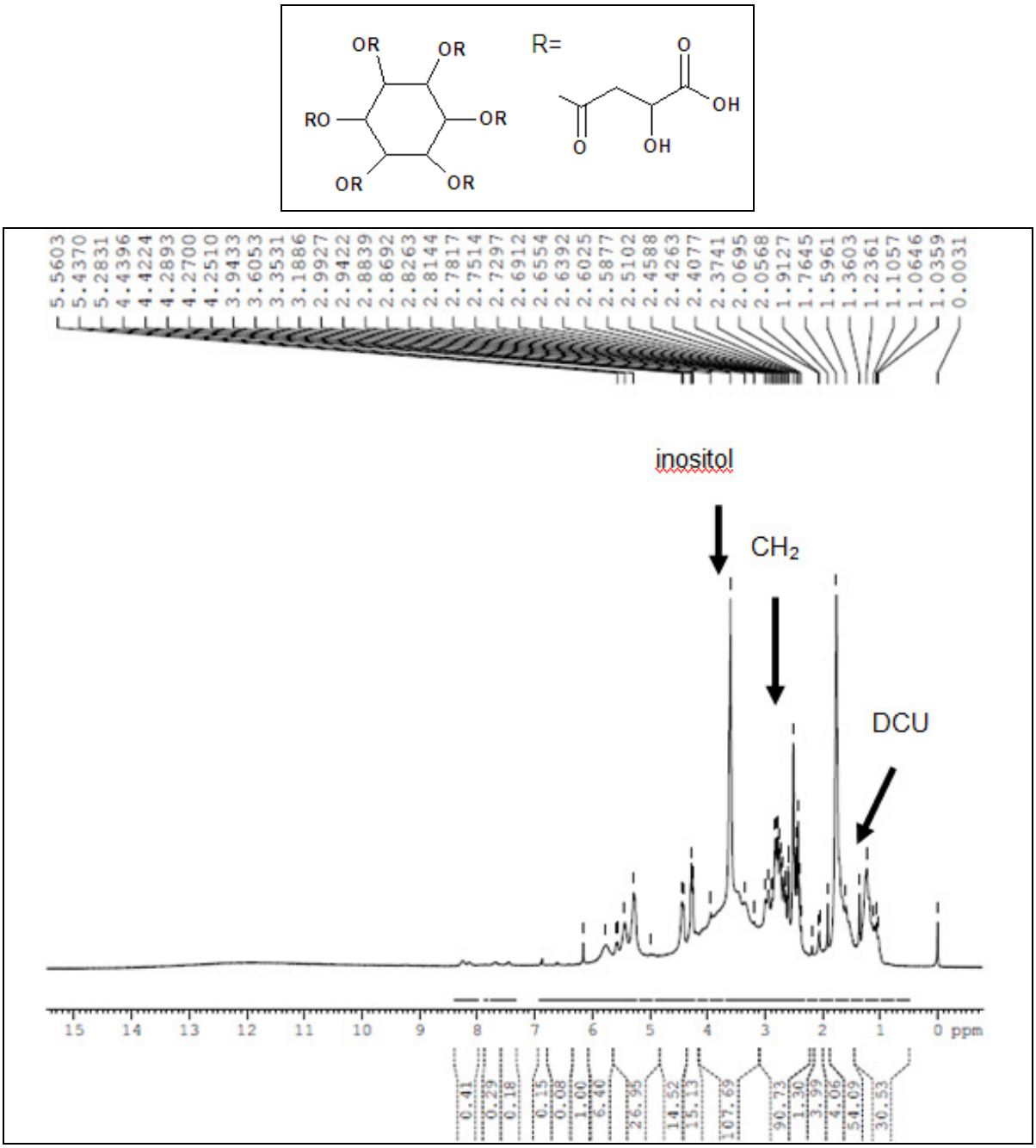
4.1.3.2.1 Desproteção do intermediário I (obtido com DCC)

Com as evidências de sucesso na reação anterior com DCC e provável obtenção do intermediário I, partiu-se para a etapa de abertura da lactona do ácido málico protegido, reação realizada com o método descrito por Ferreira e Giarolla (2008), com o uso de ácido acético, tetraidrofurano e água na proporção de 1:1:1 (v/v/v). A fase móvel utilizada para acompanhar a obtenção do malato de inositol foi clorofórmio/metanol 2:1, sendo que o intermediário I obtido com DCC apresenta R*f* 0,90 neste eluente. O malato de inositol é obtido após a desproteção do ácido málico protegido, liberando os grupos hidroxila e ácido carboxílico que estavam ligados através da lactona. A carboxila livre permitirá posterior ligação com o grupo diretor (*mio*-inositol ou *D*-manose). A hidroxila livre é importante para ligação de mais um ácido málico protegido, que, posteriormente, será ligado ao composto bioativo.

A análise por CCD mostrou mancha com R*f* igual a 0,72, diferente do material de partida, que apresentou valor de 0,90 nesta fase móvel. Este resultado indica a formação de produto com caráter mais polar, o que sugere a hidrólise da lactona do ácido málico protegido. Em adição, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 30) não apresenta sinais em 1,54 e 1,56 ppm dos hidrogênios das metilas da lactona do ácido málico protegido. Além disso, o sinal em 4,27 ppm pode ser referente à hidroxila originada pela hidrólise da lactona. Ainda em relação ao agente espaçante, evidencia-se sinal em 2,80 ppm, que sugere a presença de H_2 do ácido málico. Com relação ao foco central, inositol, observam-se sinais em 3,60 e 3,35 ppm, referentes aos hidrogênios do anel do inositol. Estes indícios sugerem a obtenção do malato de inositol.

O evidente sinal próximo de 2 ppm pode estar relacionado ao ácido acético utilizado para desproteção do ácido málico, reagente que apresenta difícil remoção. O excesso de sinais no espectro pode ser referente ao DCU, produto secundário da reação com DCC.

Obteve-se, como produto final, solução de cor marrom escura. O rendimento bruto foi de 58%.



Espectro 30: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro inositol e ácido málico, obtido após a hidrólise da lactona (malato de inositol), DCC como agente condensante (experimento A1).

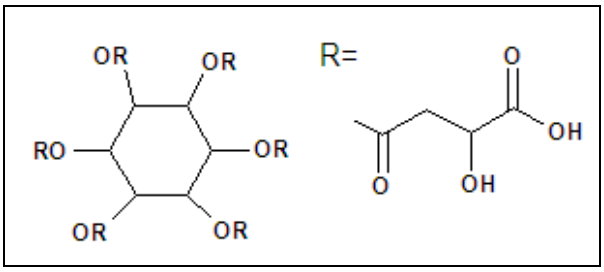
4.1.3.2.2 Desproteção do intermediário I (obtido com EDC)

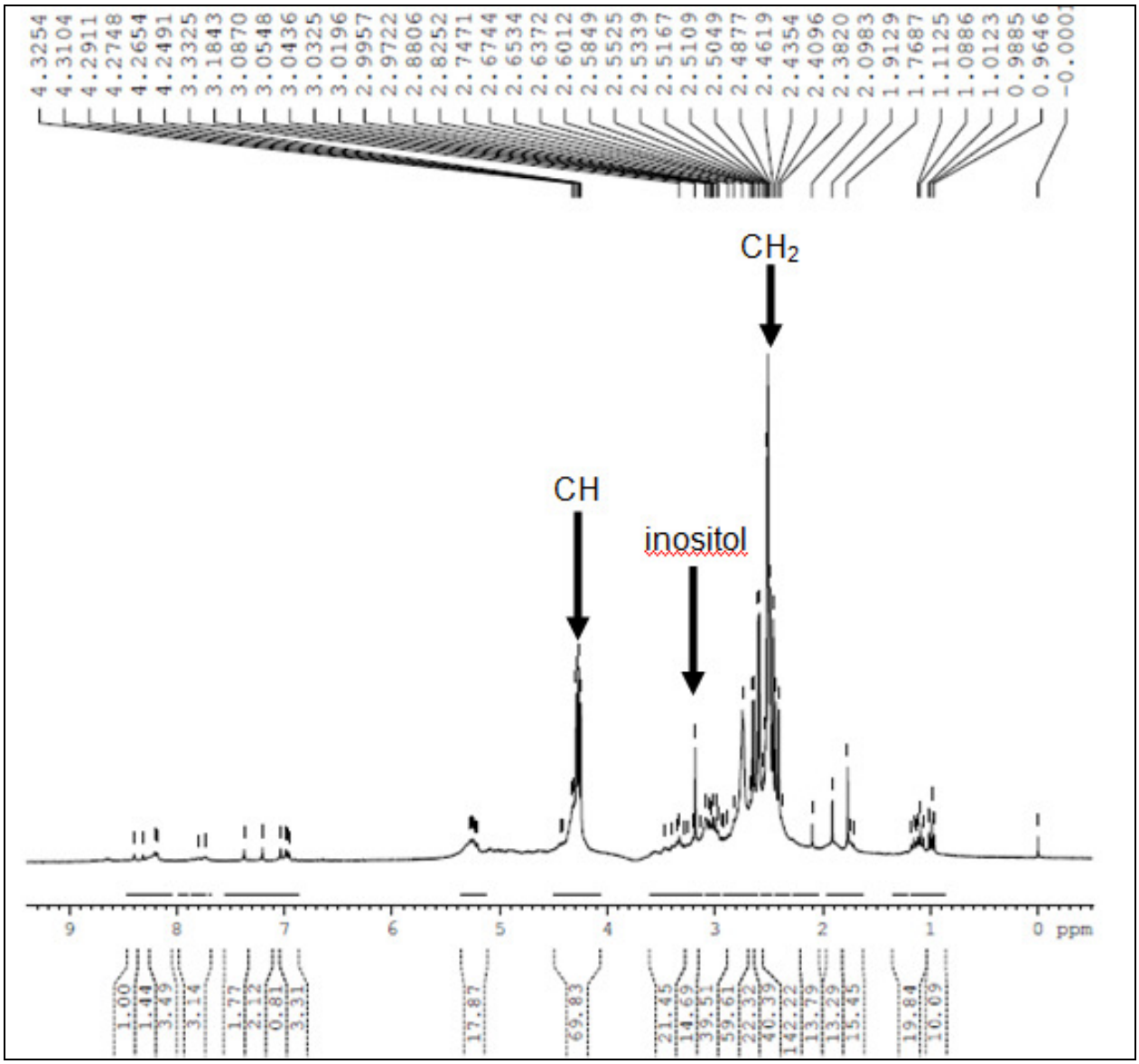
Após 24 horas, a cromatografia em camada delgada mostrou duas manchas com R*f* igual a 0,75 e 0,90. Possivelmente, a mancha com R*f* de 0,90 é referente ao material de partida, ou seja, relativa ao intermediário I. Já a mancha com R*f* de 0,75 mostra a formação de composto mais polar e pode ser referente ao malato de inositol. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 31) não apresentou sinais em 1,61 e 1,65 ppm, relacionados aos hidrogênios metílicos da lactona do ácido málico protegido. Além disso, sinais a 3,33 e a 3,18 ppm são indicativos dos hidrogênios do anel do *mio*-inositol e, também, os sinais próximos a 2,80 ppm, provavelmente, correspondem aos hidrogênios do ácido málico. Estes sinais sugerem, pois, a obtenção do malato de inositol, composto fundamental para a formação do dendrímero dirigido.

Devido à dificuldade de remoção do ácido acético, utilizado para desproteção do ácido málico, observa-se sinal pronunciado próximo de 2 ppm relacionado a este reagente. O excesso de sinais no espectro podem ser relativos ao EDU, produto secundário obtido em reações que utilizam o EDC, como agente condensante.

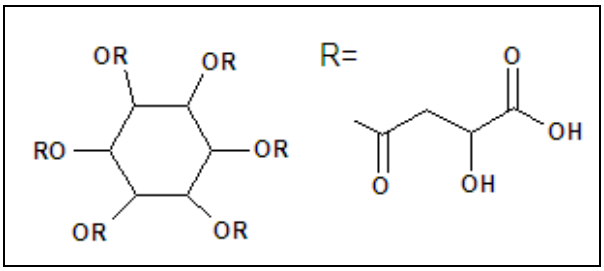
O espectro no IV (Espectro 32) apresentou bandas em 1731 cm^{-1} de éster, banda alargada de hidroxila em 3564 cm^{-1}, referente às hidroxilas não substituídas do inositol. Além disso, é possível observar bandas de estiramento CH de grupos alifáticos a 2632 cm-^{1}, banda de estiramento de OH de carboxila a 2508 cm-^{1} e deformação de CH_2 em 1435 cm^{-1}. O espectro no IV é outra evidência da obtenção do malato de inositol e, desta forma, é provável que o composto desejado tenha sido obtido, ainda de forma impura, pois se observa banda de amida em 1650 cm^{-1}, provavelmente, relativa ao produto secundário.

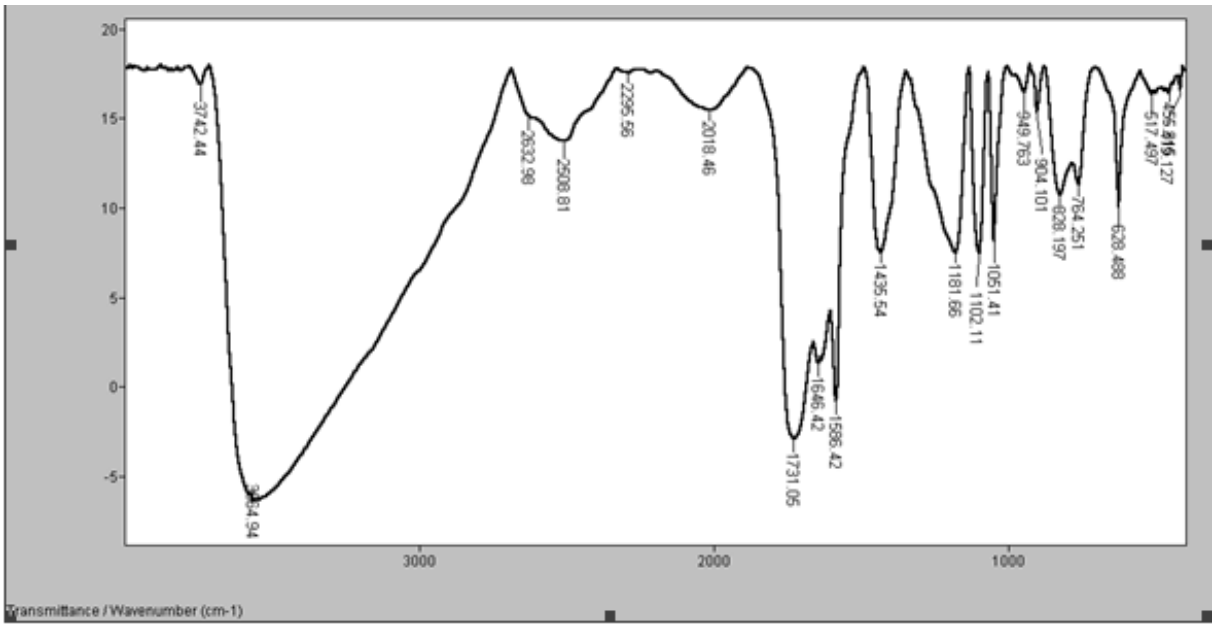
O produto desta reação apresentou caráter líquido de cor marrom escura com rendimento bruto de 57%.





Espectro 31: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro inositol e ácido málico (malato de inositol), obtido após a hidrólise da lactona, EDC como agente condensante (experimento B2).





Espectro 32: Espectro no IV do produto impuro inositol e ácido málico (malato de inositol), obtido após a hidrólise da lactona, EDC como agente condensante (experimento B2).

IV (ν, KBr, cm^{-1})
3564 (ν_{OH} álcool); 2632 (ν_{CH} alquilas); 2508 (ν_{OH} ácido carboxílico); 1731 ($\nu_{C=O}$ éster); 1646 ($\nu_{C=O}$ de amida); 1435 (δ_{CH2} angular assimétrica); 1102 (ν_{C-O} álcool); 949 (δ_{OH} álcool); 754 (δ_{CH2} angular assimétrica).

4.1.3.3 Síntese do intermediário II com DCC (Figura 35)

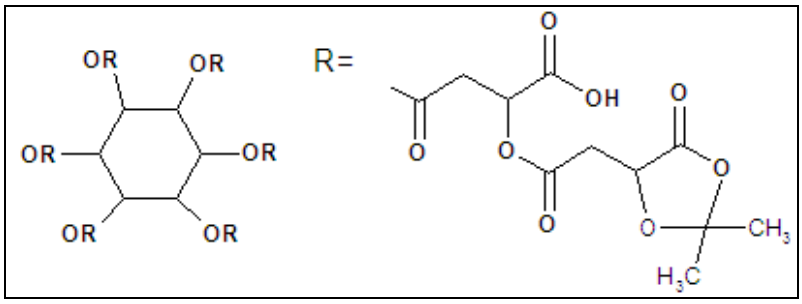
Com as evidências de obtenção do malato de inositol com o uso de DCC, prosseguiu-se para a próxima etapa do trabalho, que é a ligação de mais um ácido málico protegido, importante para posterior ligação com o NFOH.

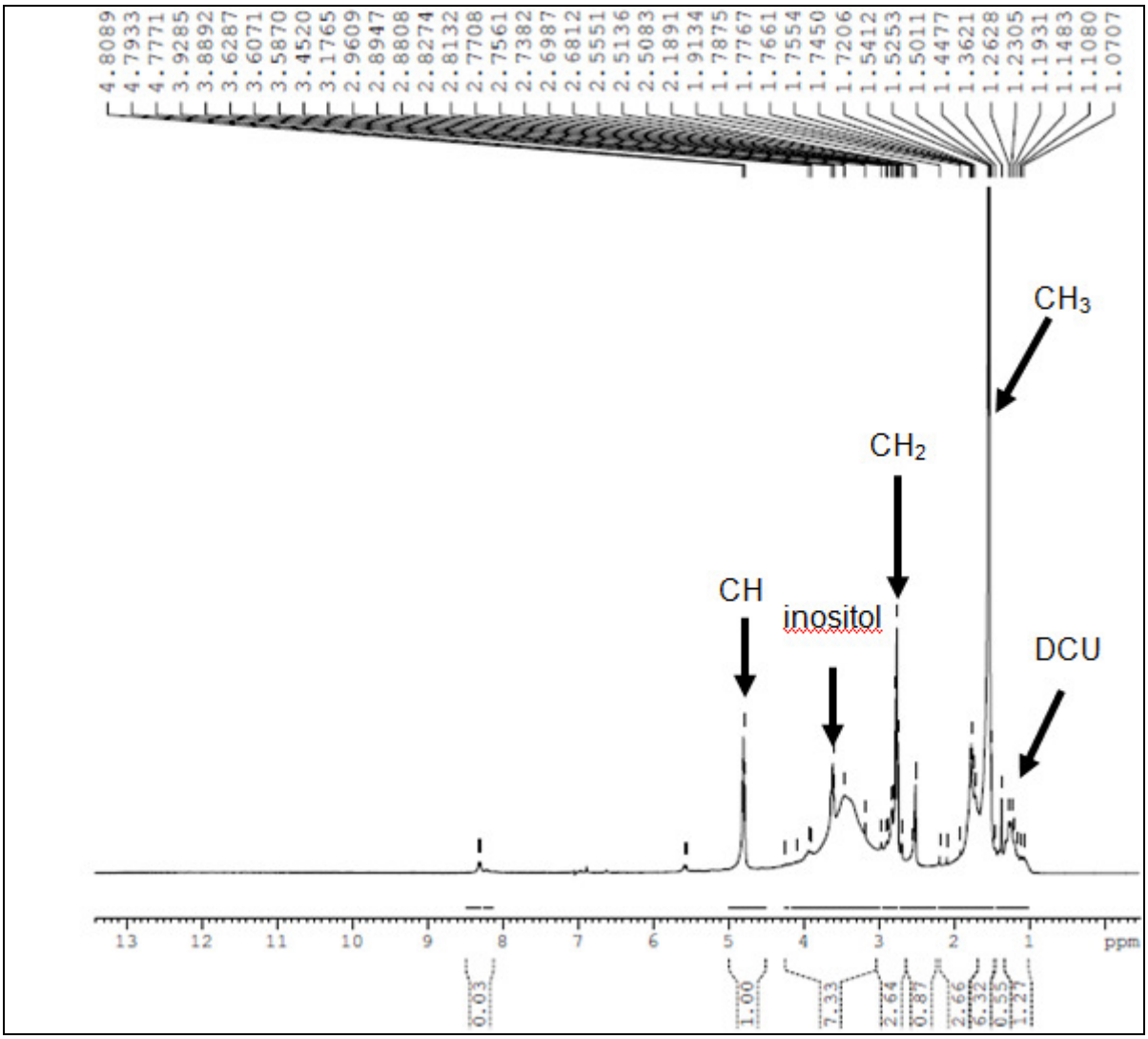
A cromatografia em camada delgada mostrou, após 24 horas de reação, mancha com R*f* de 0,88, diferente dos valores referentes ao material de partida, malato de inositol, que apresenta valor de R*f* equivalente a 0,72, o que indica a obtenção de composto com caráter mais apolar, comportamento esperado para o intermediário II.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 33) mostrou a presença dos sinais em 1,52 e 1,54 ppm, relacionados aos hidrogênios metílicos do segundo ácido málico protegido adicionado. Além disso, observam-se os sinais, provavelmente, referentes aos H_2 e H_3 em 2,80 e 4,77 ppm, do agente espaçante. Também, observam-se sinais indicativos dos hidrogênios do anel do inositol, em 3,60 e 3,17 ppm.

O excesso de sinais no espectro provavelmente se deve ao subproduto da reação, DCU.

Obteve-se, como produto final, massa sólida de cor marrom escura. O rendimento bruto foi em torno de 45%.





Espectro 33: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação entre o malato de inositol (inositol e ácido málico) e o ácido málico protegido obtidos com o uso de DCC, como agente condensante.

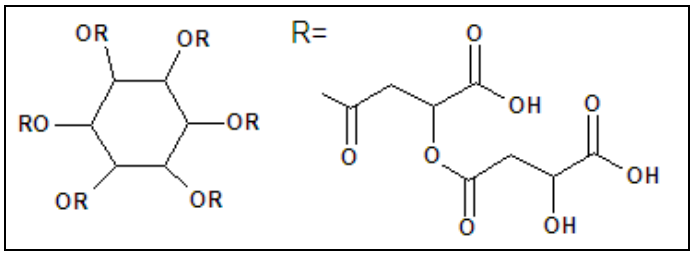
4.1.3.4 Desproteção do intermediário II, obtenção do intermediário III (Figura 36)

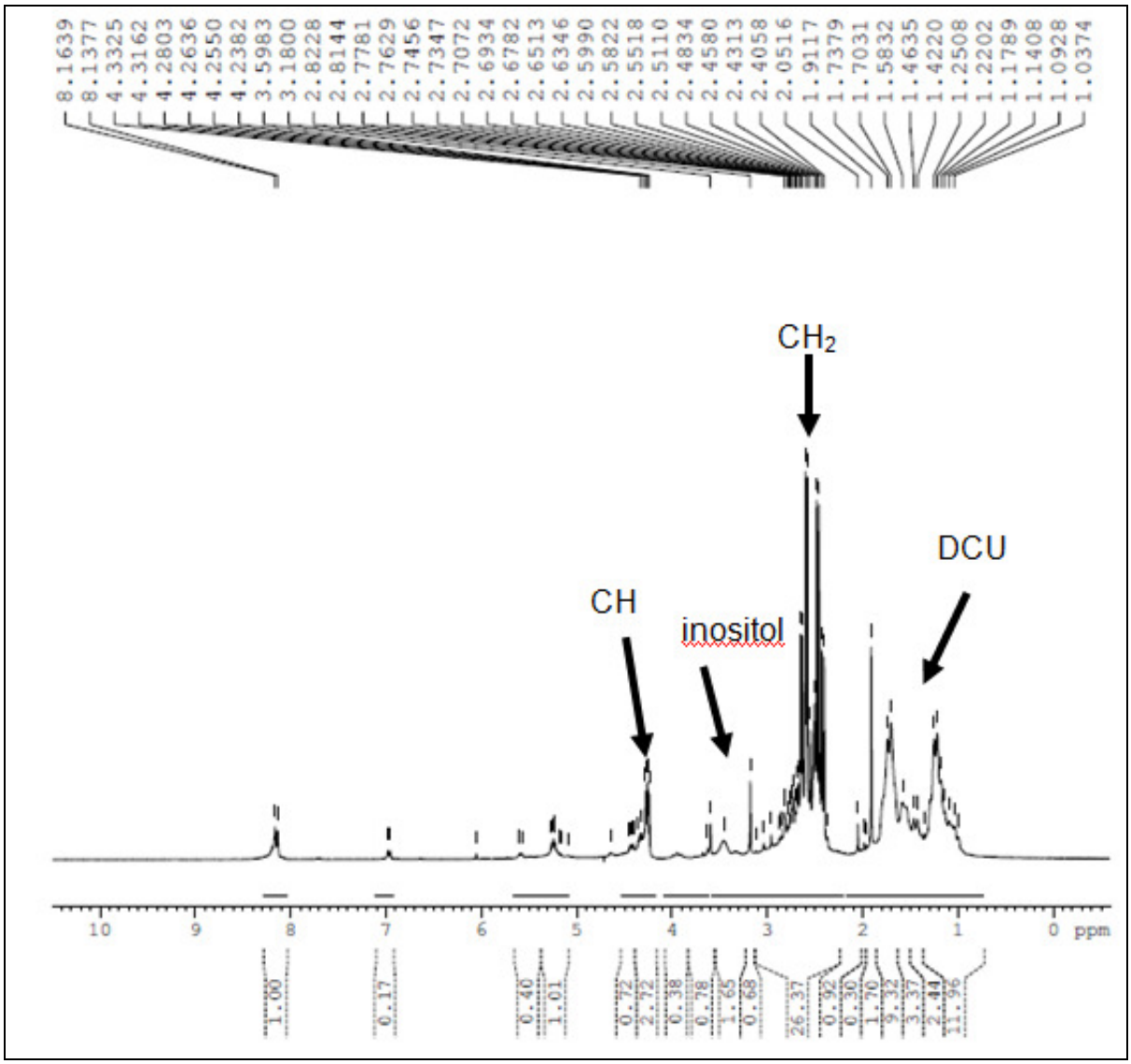
Com indícios da obtenção do intermediário II com o uso de DCC, mesmo que impuro, partiu-se para a etapa seguinte, que consiste na abertura da lactona presente no segundo ácido málico protegido incorporado na molécula para obtenção do intermediário III.

Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada mostrou mancha com R*f* 0,79, diferente da mancha observada no material de partida, com R*f* de 0,88. Além disso, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro 34) não mostrou os sinais em 1,52 e 1,54 ppm, referentes aos hidrogênios das metilas da lactona do ácido málico protegido, o que sugere ter ocorrido a desproteção desejada. Em adição, observaram-se sinais que podem estar relacionados aos hidrogênios do ácido málico, H_2 em 2,81 e 2,82 ppm, e o H da hidroxila livre originada pela hidrólise do grupo protetor em 4,26 e 4,28 ppm. Também, evidenciam-se sinais do anel do inositol em 3,18 e 3,59 ppm.

O espectro de RMN ^{1}H mostra sinal evidente próximo de 2 ppm, que pode estar relacionado ao acido acético utilizado para hidrólise da lactona, de difícil remoção do meio reacional. Ainda sobre o espectro, observa-se excesso de sinais decorrentes do subproduto DCU.

O composto obtido apresentou característica oleosa de coloração marrom escura. O rendimento bruto foi em torno de 59%.





Espectro 34: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação para obtenção do intermediário III (inositol - ácido málico – ácido málico), obtido com o uso de DCC, como agente condensante.

4.1.3.5 Síntese do dendrímero dirigido com manose (Figura 37)

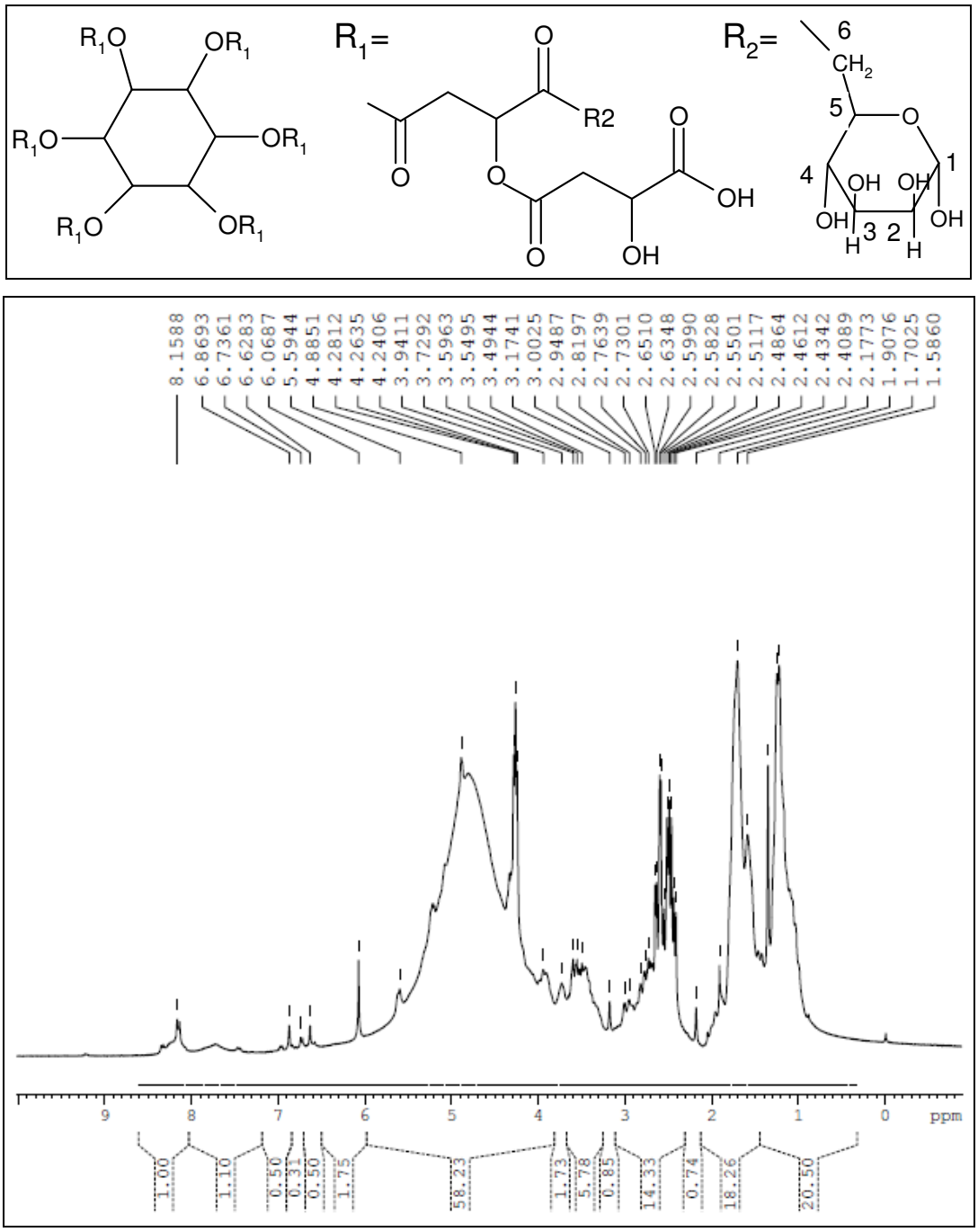
4.1.3.5.1 Ligação de manose ao intermediário III

Com os indícios de obtenção do intermediário III, realizou-se a reação de ligação de *D*-manose ao dendrímero de primeira geração.

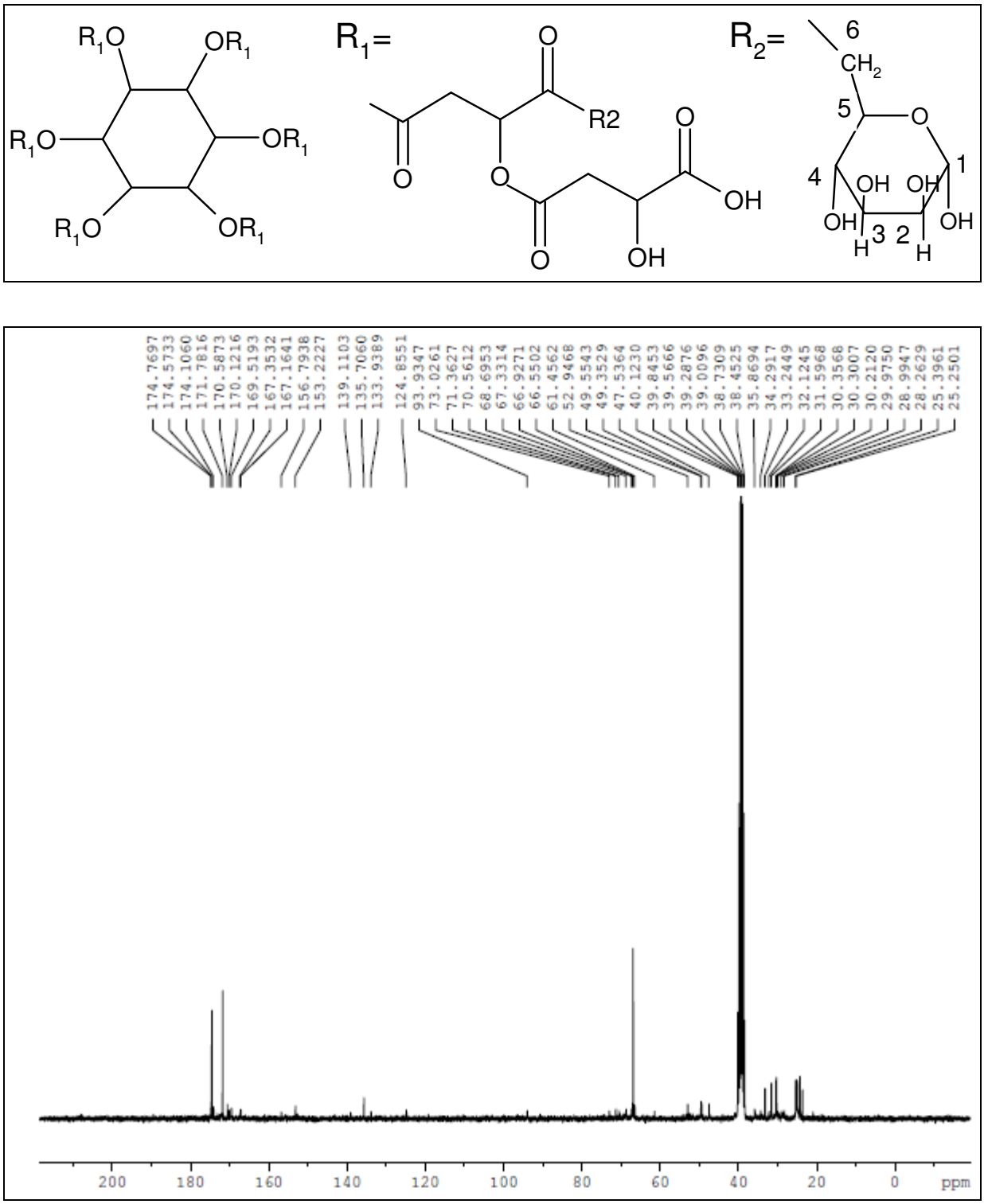
A análise em cromatografia de camada delgada, após 24 horas de reação, mostrou a formação de duas manchas com R*f* de 0,70 e 0,85, valores diferentes dos encontrados para os materiais de partida, 0,79 para o intermediário III e 0,52 para *D*-manose.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 35) apresentou sinais relativos aos hidrogênios do ácido málico, a 2,81 ppm, e a 3,59 ppm, referentes aos hidrogênios do inositol. Em adição, observaram-se sinais prováveis de manose para os hidrogênios dos carbonos C_2, C_3, C_5 e as hidroxilas presentes na manose em 3,94, 3,54, 3,72 e 4,88 ppm, respectivamente. Ainda com relação ao espectro de RMN ^{1}H, observam-se sinais entre 4 e 6 ppm, característicos da presença de manose. Entretanto, o excesso de sinais, devido aos subprodutos reacionais, dificultou a interpretação deste espectro. Desta forma, foi realizado o espectro de RMN ^{13}C (Espectro 36), que mostrou prováveis sinais de manose em 93,93, 71,36, 70,56, 73,02 e 61,45 ppm, referentes aos carbonos C_1, C_3, C_4, C_5 e C_6. Tal fato sugere que, provavelmente, o dendrímero dirigido de primeira geração com grupo diretor manose foi obtido, mas ainda se encontra com muitas impurezas, o que implica necessidade de se estabelecer condições de purificação.

Esta reação apresentou como produto final massa sólida de coloração marrom escura e rendimento bruto ao redor de 50%.



Espectro 35: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação de obtenção do dendrímero dirigido com *D*-manose, como grupo diretor, com a utilização de DCC, como agente condensante.



Espectro 36: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação de obtenção do dendrímero dirigido com *D*-manose, como grupo diretor, com a utilização de DCC, como agente condensante.

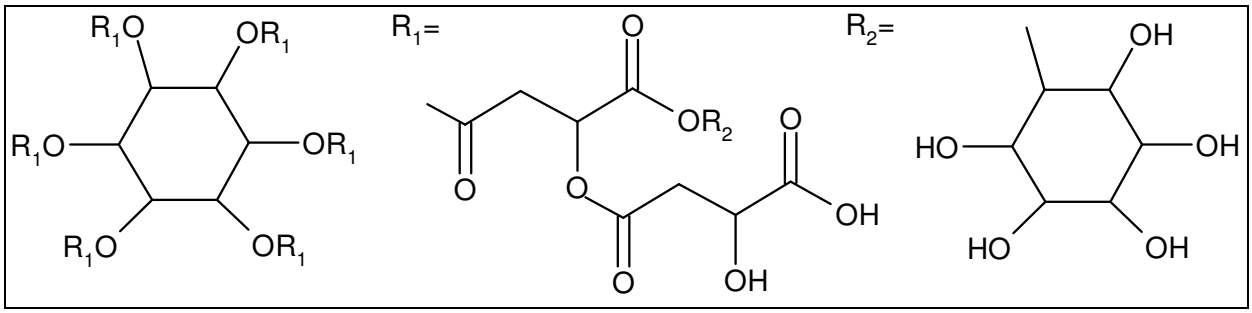
4.1.3.6 Síntese do dendrímero dirigido com inositol (Figura 38)

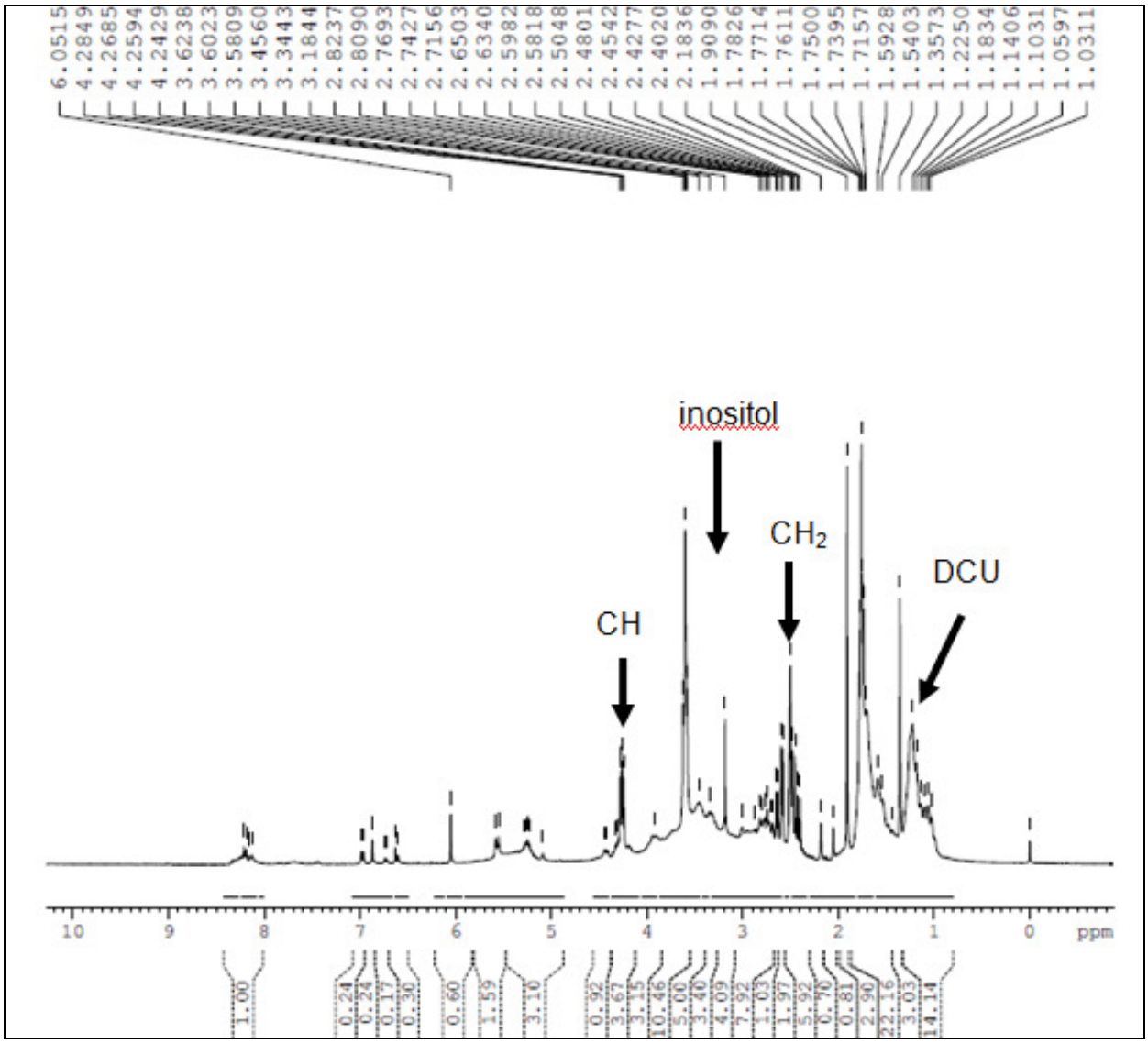
4.1.3.6.1 Ligação de inositol ao intermediário III

Com as evidências de obtenção do intermediário III com DCC, prosseguiu-se na etapa seguinte para a síntese do fármaco dirigido com inositol, ligação do inositol externamente, para atuar como grupo diretor.

Após 24 horas de reação, a análise em cromatografia em camada delgada mostrou a presença de duas manchas com R*f* igual a 0,70 e 0,88, diferente das manchas referentes ao material de partida, intermediário III (R*f* de 0,79). O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 37) sugere a obtenção do produto, pois se observam sinais de H_2 do ácido málico em 2,80 e 2,82 ppm, além de sinal em 4,28 ppm, relacionado à hidroxila livre presente no ácido málico. O espectro mostra, também, a 3 ppm sinais indicativos dos hidrogênios do inositol. Entretanto, observam-se muitos sinais que podem estar relacionados ao subproduto DCU, o que dificulta a interpretação do espectro.

O produto obtido, no término da reação, foi massa amorfa, de cor marrom escura, que apresenta difícil purificação. O rendimento bruto foi de 51%.





Espectro 37: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação de obtenção do dendrímero dirigido com inositol, como grupo diretor, com a utilização de DCC como agente condensante.

4.1.4 *Síntese dos fármacos dendriméricos dirigidos – método convergente*

O método convergente consiste na síntese das ramificações que, posteriormente, serão ligadas ao núcleo para a obtenção do dendrímero. Apesar dos problemas apresentados pelo NFOH com relação à instabilidade a luz, temperatura e condições drásticas de pH, realizaram-se algumas tentativas de esterificação deste composto bioativo ao ácido málico protegido, com o intuito de sintetizar as ramificações para posterior ligação ao foco central.

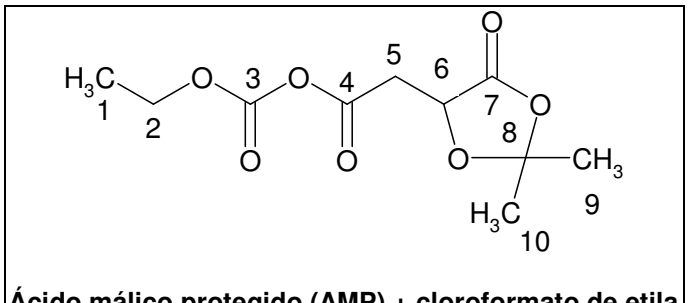
4.1.4.1 Síntese do intermediário IV (Figura 39)

4.1.4.1.1 Método G – utilizando NFOH como material de partida

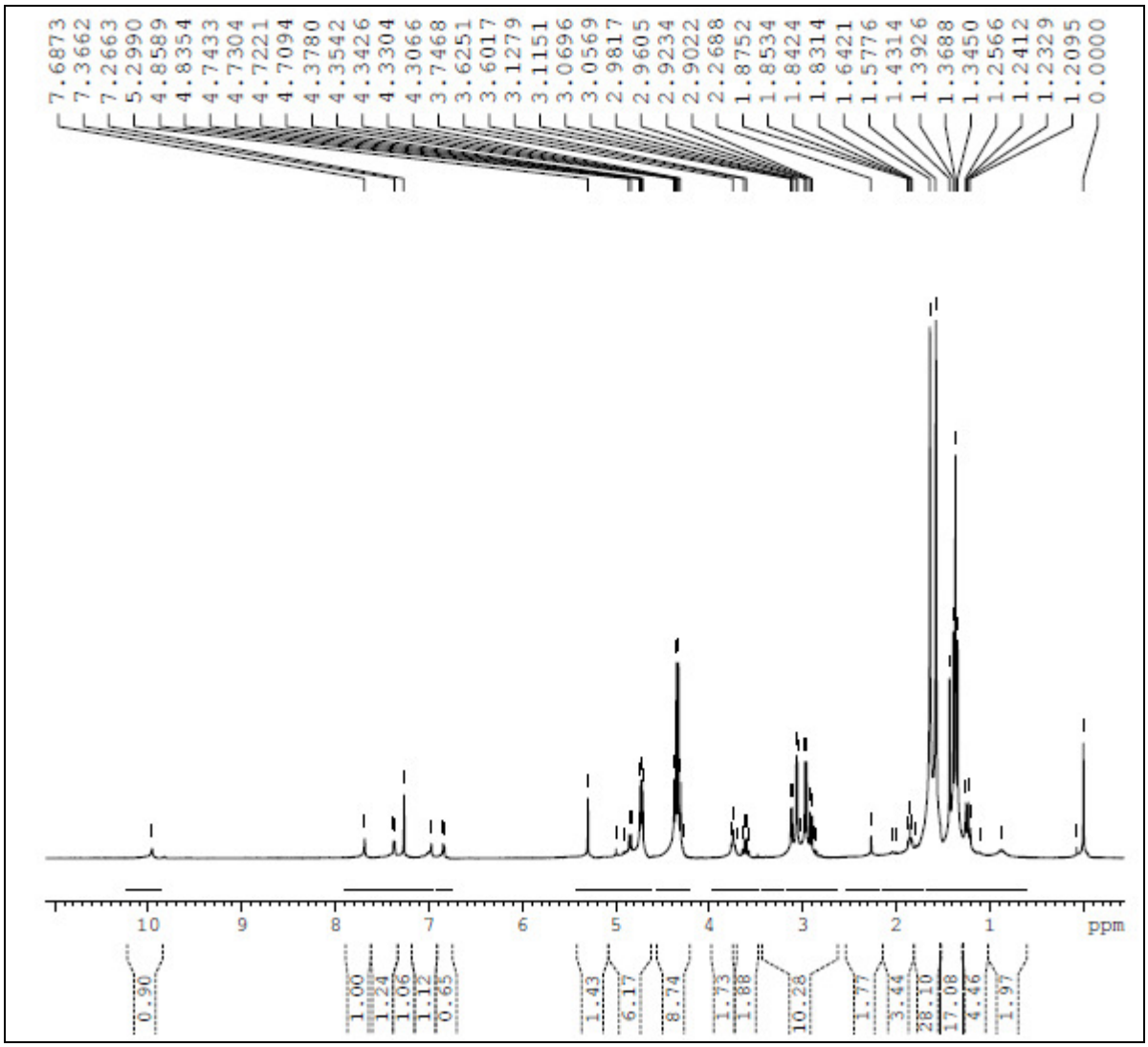
O método G utilizou cloroformato de etila, como agente condensante para a reação de esterificação, e, principalmente, empregou-se o NFOH como matéria-prima. Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada apresentou duas manchas com valores de R*f* iguais a 0,70 e 0,92. A mancha mais polar com R*f* de 0,70 está relacionada ao material de partida NFOH. Entretanto, a outra mancha apresenta carárter mais apolar, o que sugere a obtenção de um novo composto no meio reacional. Além disso, este valor de R*f* é diferente do nitrofural, precursor do NFOH, o que indica que o NFOH não foi decomposto a nitrofural.

Entretanto, o RMN ^{1}H (Espectro 38) do produto desta reação apresentou a formação do anidrido misto entre o cloroformato de etila e ácido málico protegido. Como já mencionado, este intermediário sintético faz parte do mecanismo de reação do cloroformato de etila, no entanto, este anidrido deveria ter sofrido ataque nucleofílico do álcool (NFOH) para que se formasse o éster de interesse, o que não ocorreu. A presença do anidrido misto pode ser confirmada pela presença dos sinais na região de 1,20 e 1,43 ppm, e também, pelos sinais em 4,30 ppm, referentes aos hidrogênios do grupo etila deste intermediário sintético. Além disso, são observados os singletos relativos ao ácido málico protegido em 1,57 e 1,64 ppm, sinais entre 2,80 e 3,00 ppm, bem como os sinais em 4,70 ppm que correspondem aos hidrogênios dos carbonos 6 e 7, 2 e 3 do agente espaçante. Em adição, observam-se sinais em menor intensidade na região de 7 ppm, que mostram a presença de NFOH que não reagiu. Portanto, este método não foi eficiente para a obtenção do intermediário IV.

Os estudos de modelagem molecular realizados por Giarolla e colaboradores em 2006, que analisaram os materiais de partida para a síntese de pró-fármacos dendriméricos de NFOH, mostraram que há a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo hidroxila e a carbonila presentes na estrutura deste composto bioativo, o que reduz a reatividade do NFOH. Estas interações intramoleculares podem dificultar a obtenção do intermediário IV desejado.



Ácido málico protegido (AMP) + cloroformato de etila
Intermediário de síntese obtido



Espectro 38: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre NFOH e ácido málico protegido, obtido pelo método G, que utiliza cloroformato de etila como agente condensante.

4.1.4.1.2 Esterificação *in situ*

Devido à formação dessas ligações de hidrogênio entre a hidroxila e a carbonila do NFOH, foi sugerido pela Profa. Chung Man Chin que tentássemos a síntese *in situ* destes compostos, ou seja, no mesmo meio reacional que o NFOH é sintetizado, sem o seu isolamento, com o intuito de evitar a formação dessas interações intramoleculares.

Os experimentos H1 e H2 utilizaram, respectivamente, cloroformato de etila e 4-nitrofenilcloroformato, como agentes de acoplamento.

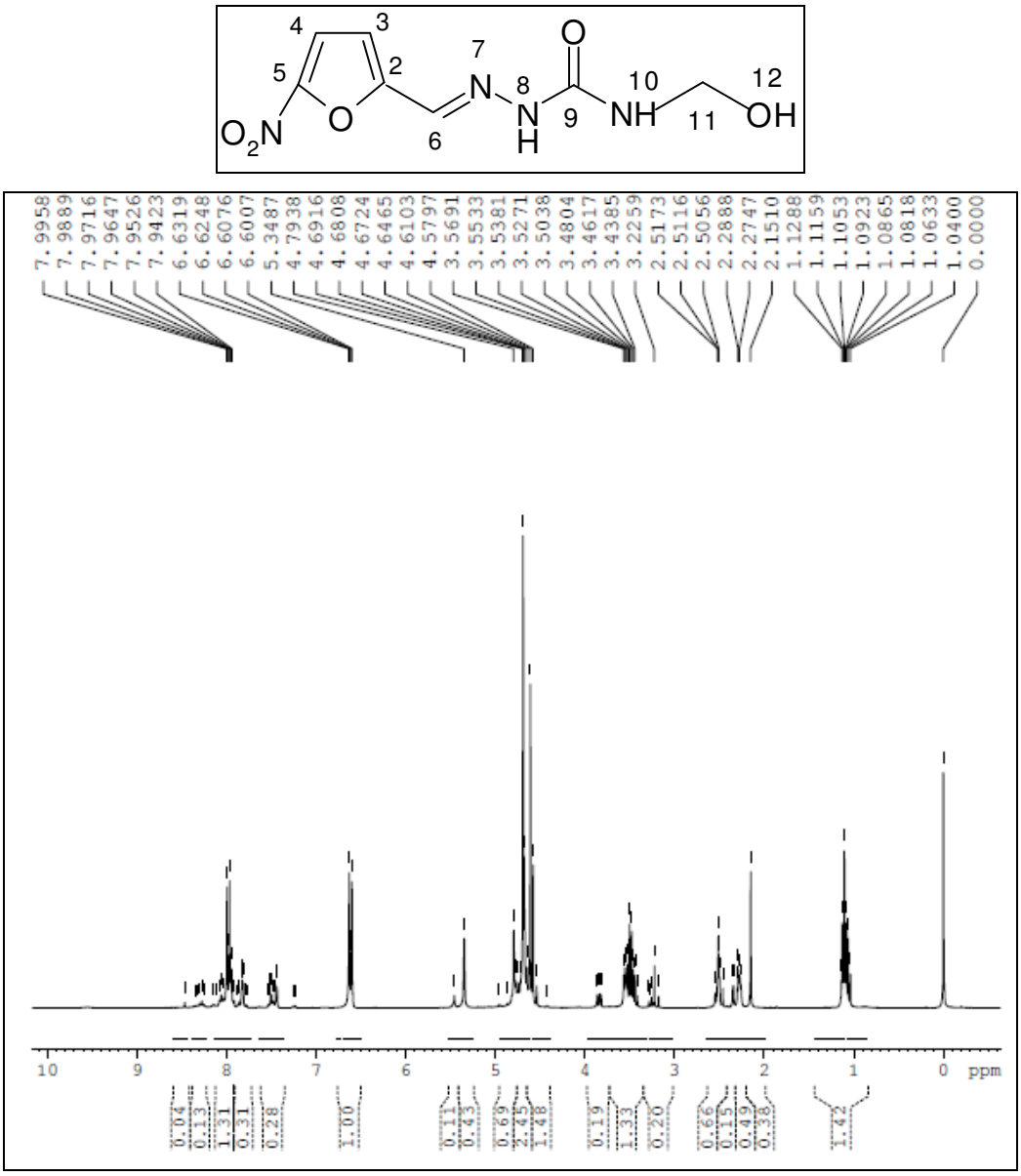
O produto obtido pelo experimento H1, a placa cromatográfica mostrou duas manchas com R*f* de 0,70 e 0,92. A primeira mancha revela a presença do material de partida NFOH e a outra mancha com R*f* 0,92, mostra a formação de produto com caráter mais apolar. No entanto, o R*f* é semelhante ao apresentado no método G pelo anidrido misto formado.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 39) do composto obtido com o experimento H1 apresentou apenas os reagentes utilizados nesta reação, NFOH e cloroformato de etila. No espectro, é possível observar os sinais em 4,60 ppm e em 5,00 ppm, provavelmente, relativos aos hidrogênios do grupo metilênico e da hidroxila, bem como os sinais na região de 7,00 ppm que, também, caracterizam a presença de NFOH que não reagiu. Além disso, o espectro não apresenta sinais que possam estar relacionados ao ácido málico protegido, o que indica que o intermediário IV de interesse não foi obtido. Em adição, são observados sinais em 1,10 e em 3,50 ppm, provavelmente relacionados ao agente condensante e ao catalisador, respectivamente, cloroformato de etila e *N*-metilmorfolina. Dessa forma, o experimento H1não foi efetivo para a síntese do intermediário IV.

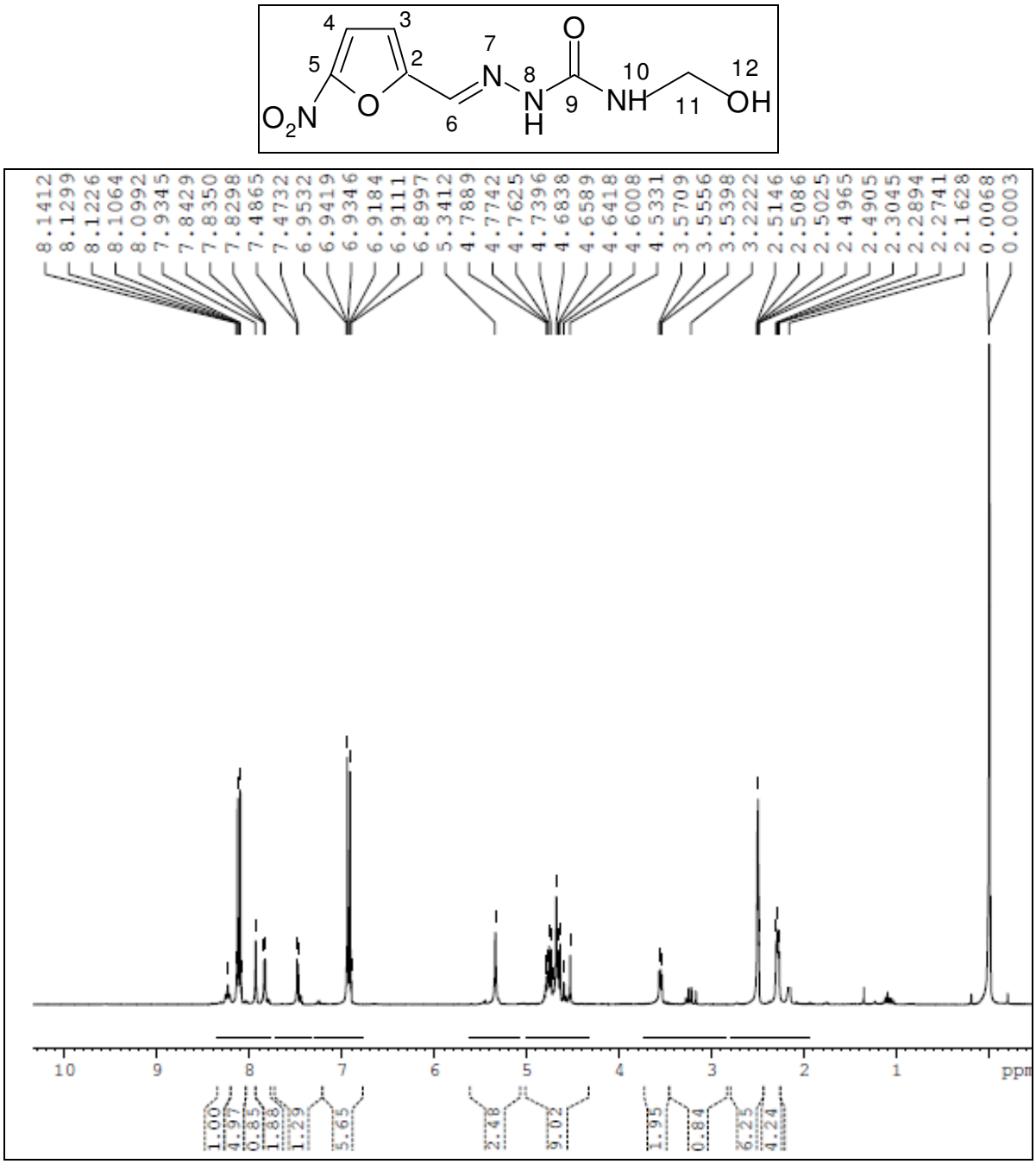
Para o experimento H2, utilizou-se o 4-nitrofenilcloroformato com o objetivo de aumentar a reatividade do anidrido misto formado no meio reacional para, desta forma, favorecer o ataque nucleofílico do álcool (NFOH). Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada do composto obtido pelo experimento H2 apresentou apenas mancha com R*f* 0,69, valor referente ao NFOH, resultado similar ao obtido com o experimento H1. Não se formou, portanto, o composto desejado.

Outra tentativa realizada foi o método I, que consiste no uso de ácido sulfúrico para catalisar a reação de esterificação. No entanto, a placa cromatográfica não indicou a formação de um composto diferente, mas, apenas, a formação da mancha característica de NFOH com R*f* de 0,70, resultado similar aos obtidos com os

experimentos H1 e H2. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro 40) do composto obtidomostrou a presença apenas dos sinais relacionados ao composto bioativo com ausência dos sinais referentes aos hidrogênios do ácido málico protegido, o que revela que o intermediário IV não foi sintetizado por este experimento. Dessa forma, as tentativas de esterificação *in situ* não foram eficientes para a síntese do intermediário ácido málico protegido-NFOH.



Espectro 39: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação entre NFOH e ácido málico protegido, obtido pelo experimento H1(*in situ*), que utiliza cloroformato de etila como agente condensante.



Espectro 40: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação entre NFOH e ácido málico protegido, obtido pelo método I (*in situ*), esterificação de Fisher.

4.2 Modelagem molecular

4.2.1 Estudo de liberação dos dendrímeros dirigidos de primeira geração

Seguindo o trabalho realizado por Giarolla *et al.* (2010, 2012), os estudos de modelagem molecular foram aplicados com o objetivo de obter informações sobre a liberação dos dendrímeros planejados. Planejaram-se os dendrímeros com *mio*-inositol (foco central e grupo diretor), *D*-manose (grupo diretor), ácido L(-)-málico (*dendron* e agente espaçante) e NFOH como composto bioativo. Os modelos contendo uma, duas, três, quatro, cinco e seis ramificações com manose e inositol como grupos diretores foram construídos para análise do comportamento destes na presença de esterases inespecíficas. As enzimas podem atuar em quatro pontos das ramificações: grupos carbonílicos presentes nos modelos dendriméricos planejados, denominando-se C_1 a carbonila próxima ao foco central inositol, C_2 o carbono carbonílico externo que está ligado aos grupos diretores (inositol e manose), C_3 o grupamento carbonila ligado ao segundo ácido málico e C_4 o carbono carbonílico próximo ao agente bioativo NFOH (Figura 46).

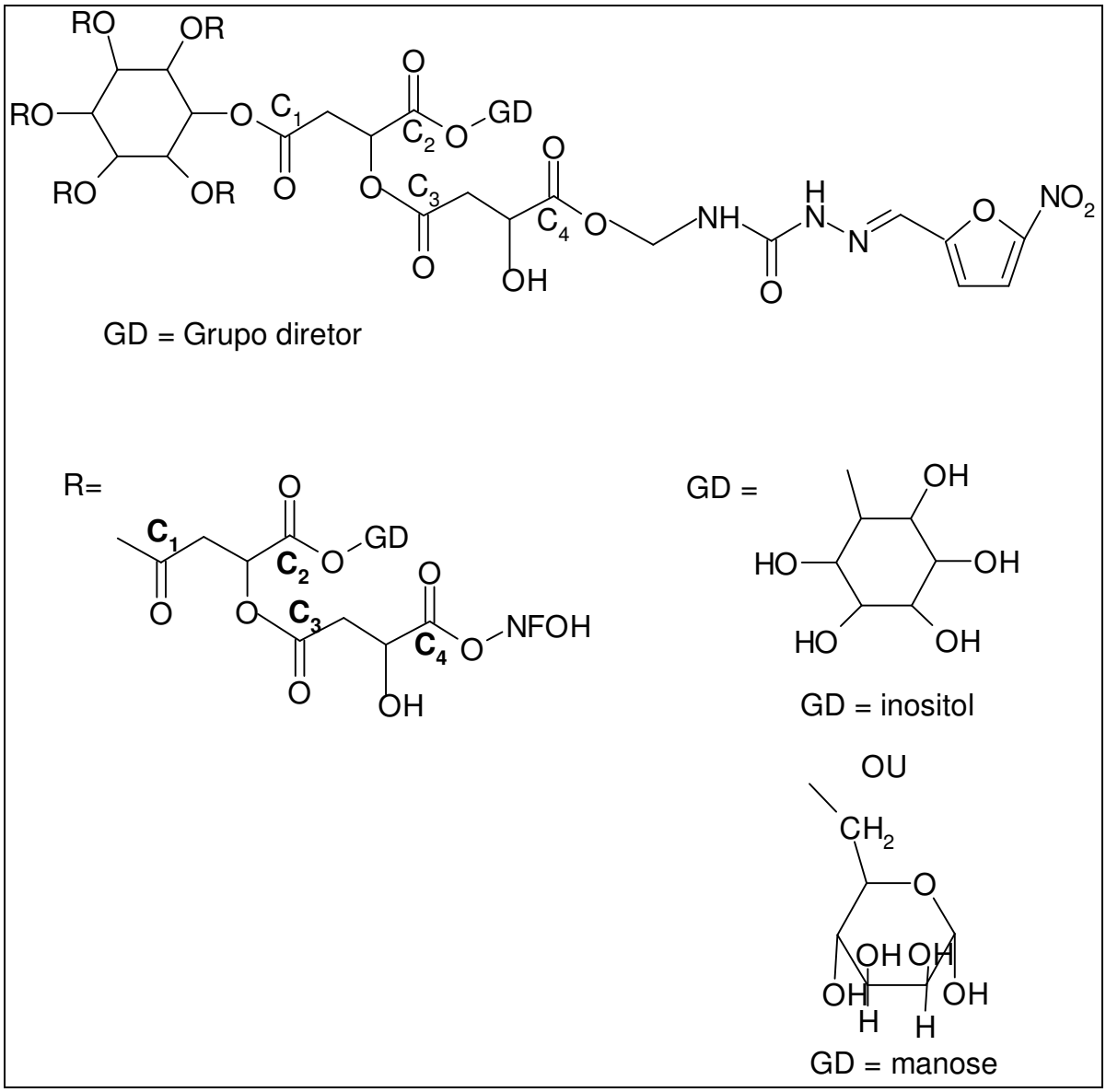


Figura 46: Representação esquemática do dendrímero planejado, constituído por *mio*-inositol, ácido L(-)-málico, grupo diretor (*mio*-inositol e *D*-manose) e composto antiprotozoário bioativo NFOH. Em destaque os grupos carbonílicos suscetíveis à clivagem. GD-Grupo Diretor.

A disposição espacial dos grupos carbonílicos foi avaliada para obter informações com relação à disponibilidade destas ao ataque nucleofílico de esterases inespecíficas, sob o ponto de vista estérico. Em adição, outros parâmetros foram analisados, como a densidade eletrônica das carbonilas, através das cargas de potencial eletrostático, aspecto importante para determinar a suscetibilidade destes grupos ao ataque enzimático. Ademais, o número de ligações de hidrogênio

foi avaliado, pois esta interação é uma das contribuições importantes para a estabilidade dos modelos gerados.

Os confôrmeros de menor energia mínima, obtidos das simulações de dinâmica molecular, foram avaliados quanto à integridade estrutural pelo desvio da raiz dos quadrados mínimos (*root means square deviation*-RMSD), por meio da sobreposição de suas estruturas. Para sistemas com grande número de átomos, a integridade estrutural é mantida quando o valor de RMSD é inferior a 1,5 Å (TOKARSKI, HOPFINGER,1997). Com o auxílio do *software Hyperchem 7.51,* observou-se que os modelos gerados mantiveram a integridade estrutural, pois todos apresentaram valor de RMSD abaixo do desse valor (Tabela X).

Os valores de energia total (Etotal) são relativos ao somatório de todas as contribuições energéticas da estrutura e quanto menor este valor mais energeticamente favorável é este modelo. As contribuições energéticas que determinam a Etotal do sistema são: 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 (GIAROLLA *et al.*, 2010). Todos os modelos estudados apresentaram valores de Etotal negativos, portanto, foram energeticamente favoráveis para o estudo (Tabela X).

Os dendrímeros dirigidos de manose apresentaram aumento progressivo no número de ligações de hidrogênio (3, 4, 6, 15, 15 e 23 ligações de hidrogênio, respectivamente, para os dendrímeros com uma, duas, três, quatro, cinco e seis ramificações). Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado para os dendrímeros dirigidos de inositol, nos quais se observou aumento gradual no número de ligações de hidrogênio até o dendrímero com quatro ramificações (0, 4, 9, 27 ligações para os dendrímeros dirigidos de inositol com uma, duas, três, e quatro ramificações, respectivamente). Já os modelos com cinco e seis ramificações apresentaram redução no número de ligações de hidrogênio, com 8 e 16 ligações, respectivamente. Estas interações contribuem para a conformação espacial adquirida por estas moléculas.

O sistema que apresentou maior estabilidade foi o dendrímero dirigido de manose, com seis ramificações e Etotal -1235,00 kcal/mol, além de realizar 16 ligações de hidrogênio. A energia de ligação de hidrogênio, neste caso, contribuiu com -1404,20 kcal/mol.

A conformação adotada pelos dendrímeros com cinco e seis ramificações com grupo diretor *D*-manose permitiu a formação de maior número de ligações de hidrogênio. Estes modelos apresentaram maior aproximação entre as ramificações, promovendo aumento no número de ligações de hidrogênio entre o grupo diretor e o NFOH. O mesmo comportamento não foi observado nos dendrímeros dirigidos com cinco e seis ramificações de *mio*-inositol. Nestes casos, observou-se maior distanciamento entre as ramificações, o que diminuiu o número de ligações de hidrogênio formadas entre o grupo diretor e o composto ativo e as ligações de hidrogênio formadas entre os átomos do próprio NFOH.

Tabela X – Parâmetros dos dendrímeros com uma, duas, três, quatro, cinco e seis ramificações constituídos por NFOH e grupos diretores (inositol e manose)

Dendrímero de NFOH	Etotal (kcal/mol)	RMSD (Å)	Número de ligações de hidrogênio
Uma ramificação			
mio-inositol	-149,62	0,32	-
D-manose	-38,45	0,70	3
Duas ramificações			
mio-inositol	-360,66	0,59	4
D-manose	-278,42	0,21	4
Três ramificações			
mio-inositol	-453,25	0,29	9
D-manose	-422,17	0,09	6
Quatro ramificações			
mio-inositol	-940,22	0,96	27
D-manose	-685,96	0,31	15
Cinco ramificações			
mio-inositol	-577,89	0,25	8
D-manose	-780,49	0,48	15
Seis ramificações			
mio-inositol	-1235,00	0,83	16
D-manose	-966,78	1,40	23

Para avaliação do impedimento estérico e disposição espacial, com o objetivo de prever os pontos mais disponíveis para clivagem por ataque enzimático, utilizaram-se modelo CPK e mapa de superfície de acessibilidade ao solvente. O mapa de potencial eletrostático (MPE) auxiliou a avaliação das carbonilas com menor densidade eletrônica, portanto mais eletrofílicas, que poderiam ser mais suscetíveis ao ataque nucleofílico de esterases inespecíficas.

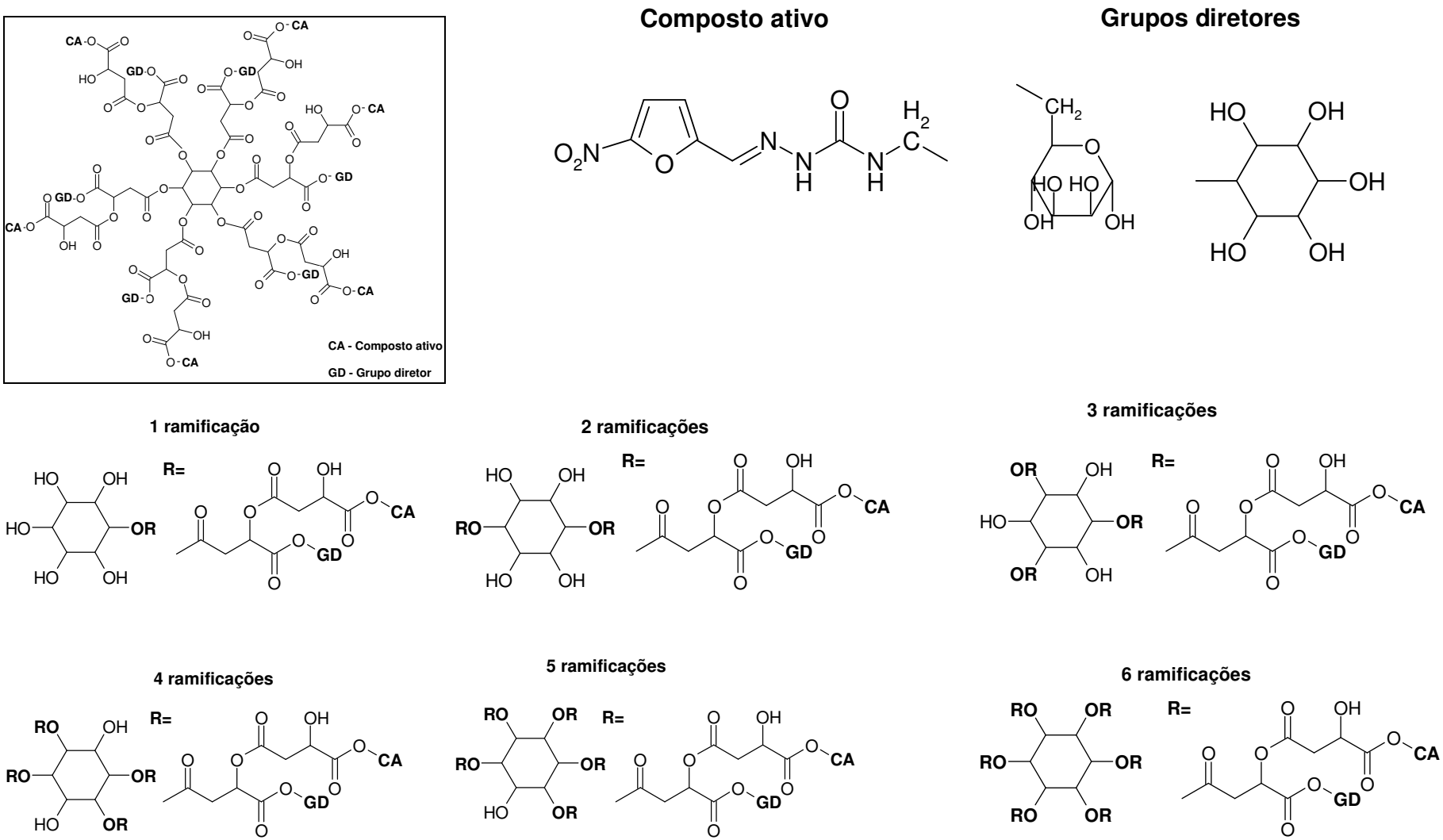


Figura 47: Representação esquemática dos modelos estudados em modelagem molecular.

Para cada dendrímero planejado com NFOH observaram-se diferentes comportamentos. Nos dendrímeros com uma ramificação, tanto de *D*-manose quanto de *mio*-inositol (Figura 47), como grupos diretores, a carbonila que apresentou maior probabilidade de sofrer ataque nucleofílico foi a C_1, carbono carbonílico que liga o foco central ao ácido málico. Avaliando o mapa de potencial eletrostático, este grupamento apresentou menor densidade eletrônica (coloração azul), o que demonstra a deficiência em elétrons desta região da molécula. Os dados de impedimento estérico (modelo CPK e mapa de superfície de acessibilidade ao solvente) corroboram esta predição, pois a maior disponibilidade espacial foi observada nesta região, como demonstrado na Figura 48.

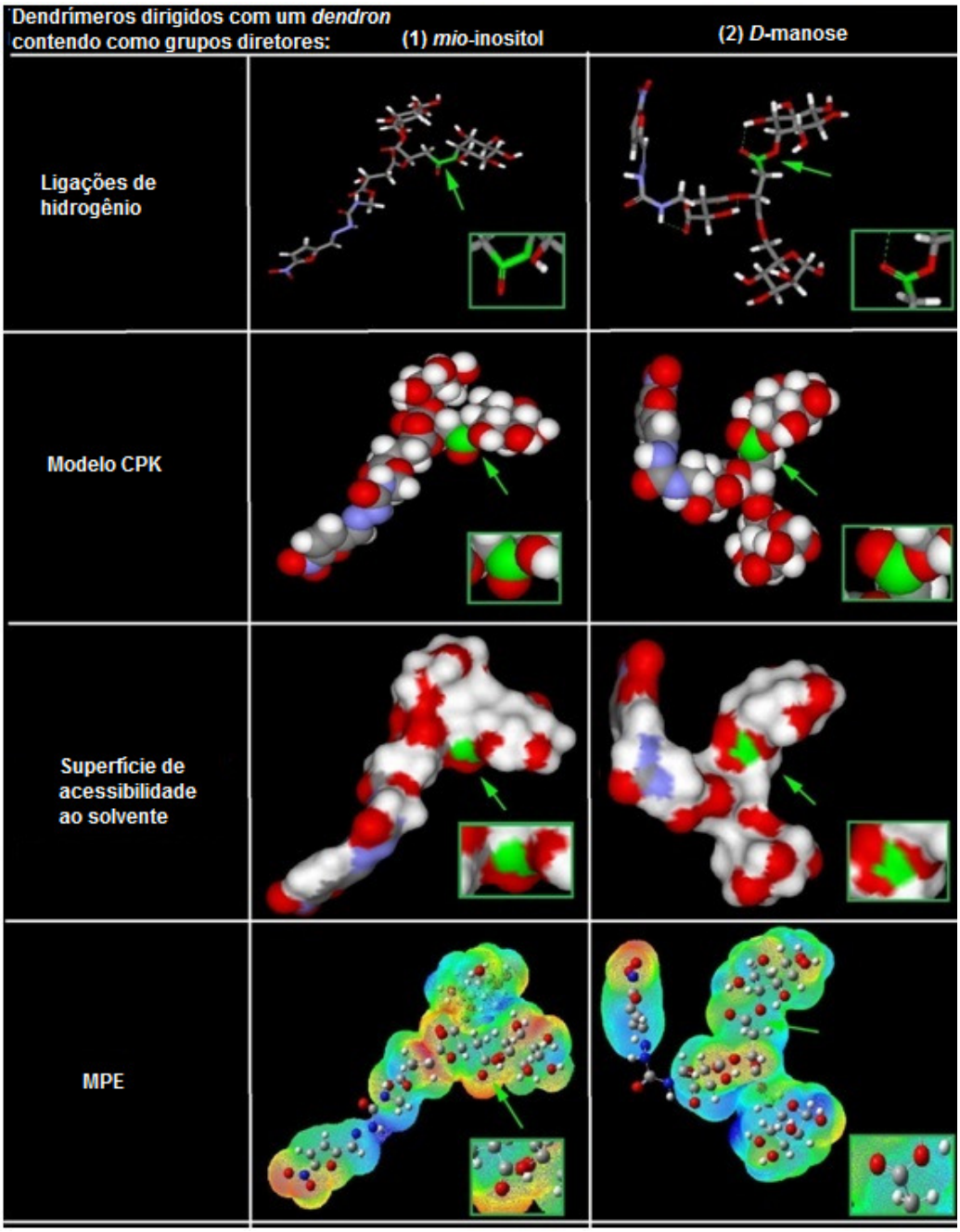


Figura 48: Modelos 3D dos dendrímeros com uma ramificação de NFOH com *mio*-inositol (1) e NFOH com *D*-manose (2). As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas verdes pontilhadas, modelo CPK, mapa de superfície de acessibilidade ao solvente (MSAS) e mapa de potencial eletrostático (MPE). A faixa de coloração do MPE foi de -7,5 (vermelho) a 7,5 (azul) e^{-2}. Esquema de cores: carbono (cinza), hidrogênio

(branco), O (vermelho), nitrogênio (azul). Os grupos carbonílicos mais suscetíveis à ação enzimática estão destacados em verde no modelo CPK e no MSAS.

Para o dendrímero dirigido com duas ramificações contendo *mio*-inositol (Figura 47), como grupo diretor, o mapa de superfície de acessibilidade ao solvente e o modelo CPK mostraram o grupo carbonílico C_1, como o ponto mais promissor a sofrer ação enzimática, pois esta região apresentou maior disponibilidade espacial. Adicionalmente, esta carbonila mostrou menor distribuição de densidade eletrônica (região neutra/positiva), o que favorece o ataque nucleofílico. Portanto, o grupo carbonílico que liga o *mio*-inositol (foco central) ao ácido málico protegido é a região mais provável de sofrer ação enzimática (Figura 49).

Já, para o dendrímero com duas ramificações constituído por grupo diretor *D*-manose (Figura 47), o grupo carbonílico que apresenta maior suscetibilidade para o ataque enzimático é o C_4, carbonila próxima ao composto ativo (NFOH). Esta região apresentou menor impedimento estérico no mapa de superfície de acessibilidade ao solvente e modelo CPK. Além disso, o mapa de potencial eletrostático mostrou que esta região apresenta menor densidade eletrônica em relação às demais carbonilas avaliadas (Figura 49).

Para os sistemas com três ramificações, de ambos os grupos diretores, *mio*-inositol e *D*-manose (Figura 47), os mapas de superfície de acessibilidade ao solvente e modelo CPK revelaram o grupo carbonílico próximo ao foco central, *mio*-inositol, como a região com maior disponibilidade espacial, o que permite aproximação enzimática, fundamental para a liberação dos dendrímeros. Ademais, os resultados observados no mapa de potencial eletrostático mostraram, também, a carbonila próxima ao núcleo do dendrímero como o grupo com menor densidade eletrônica, quando comparada aos outros grupos carboílicos analisados. Dessa forma, os resultados indicam que a carbonila próxima ao foco central é o ponto mais vulnerável para a clivagem enzimática nestes sistemas (Figura 50).

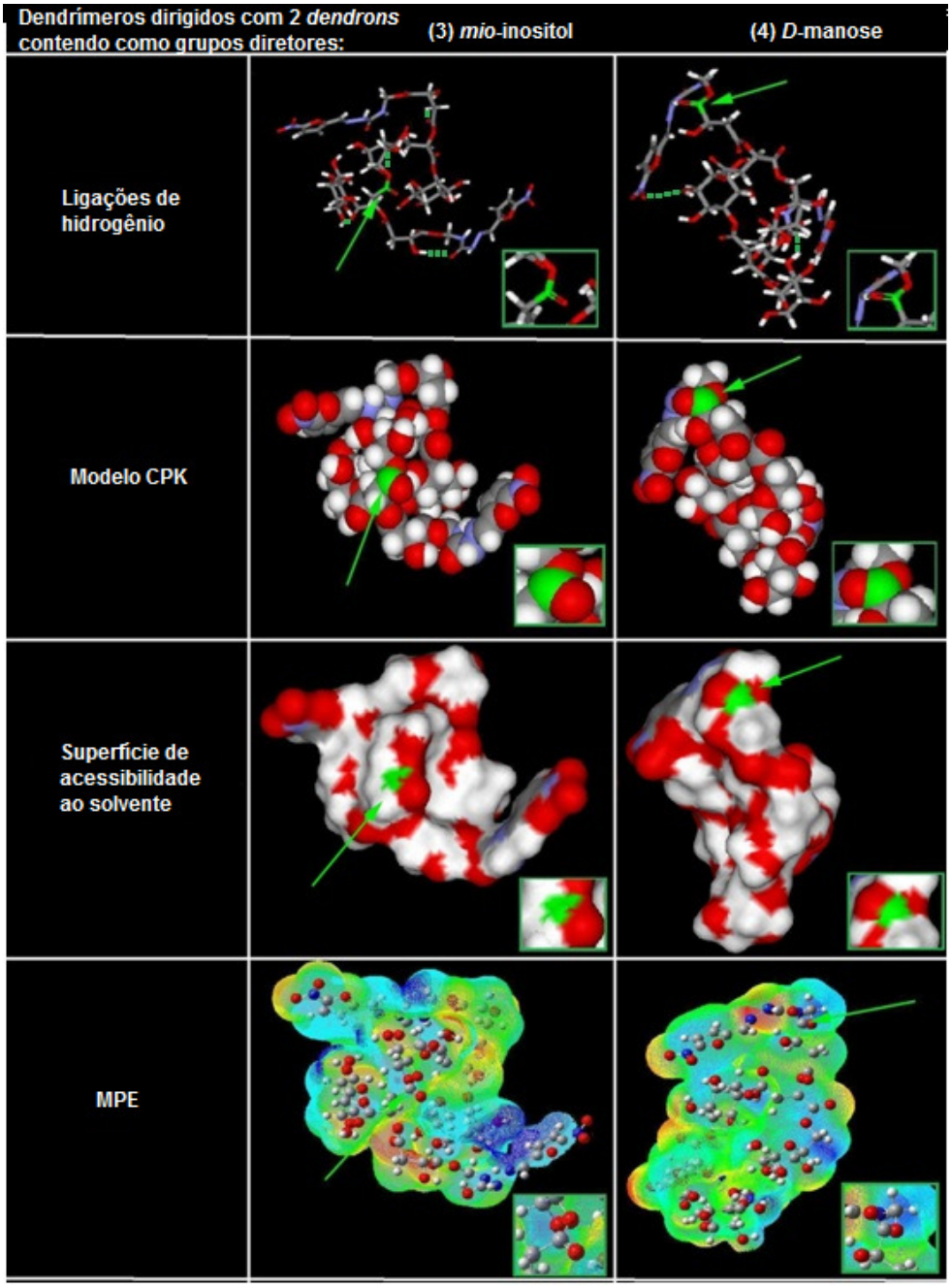


Figura 49: Modelos 3D dos dendrímeros com duas ramificações de NFOH com *mio*-inositol (3) e NFOH com *D*-manose (4). As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas verdes pontilhadas, modelo CPK, mapa de superfície de acessibilidade ao solvente (MSAS) e mapa de potencial eletrostático (MPE). A faixa de coloração do MPE foi de -7,5 (vermelho) a 7,5 (azul) e^{-2}. Esquema de cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), O (vermelho), nitrogênio (azul). Os grupos carbonílicos mais suscetíveis à ação enzimática estão destacados em verde no modelo CPK e no MSAS.

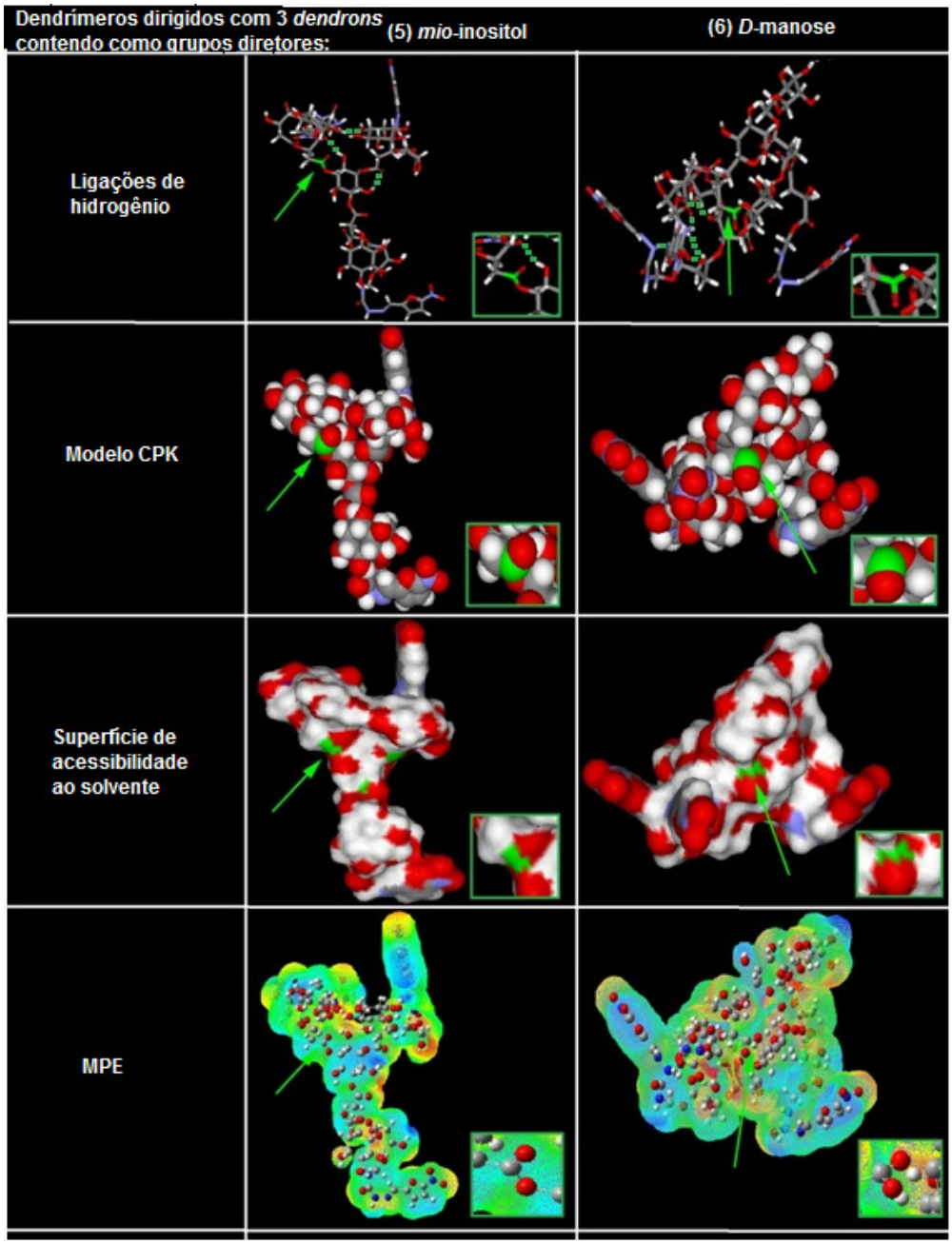


Figura 50: Modelos 3D dos dendrímeros com três ramificações de NFOH com *mio*-inositol (5) e NFOH com *D*-manose (6). As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas verdes pontilhadas, modelo CPK, mapa de superfície de acessibilidade ao solvente (MSAS) e mapa de potencial eletrostático (MPE). A faixa de coloração do MPE foi de -7,5 (vermelho) a 7,5 (azul) e^{-2}. Esquema de cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), O (vermelho), nitrogênio (azul). Os grupos carbonílicos mais suscetíveis à ação enzimática estão destacados em verde no modelo CPK e no MSAS.

Para os dendrímeros com quatro, cinco e seis ramificações, a análise do potencial eletrostático não foi realizada com o uso de mapa de potencial eletrostático porque estes sistemas são muito grandes e apresentam elevado número de átomos, o que dificulta o processamento para visualização gráfica no *software* Gaussview da plataforma *Windows*. Entretanto, o programa Gaussian G03 realizou os cálculos das cargas ChelpG (cargas atômicas parciais de potencial eletrostático) e a análise da densidade eletrônica foi realizada com o uso destes valores. Os modelos foram visualizados com as ligações de hidrogênio, modelo CPK e mapa de superfície de acessibilidade ao solvente.

Tabela XI – Valores das cargas atômicas parciais de potencial eletrostático dos dendrímeros constituídos por quatro ramificações de *mio*-inositol e *D*-manose

Dendrímeros	***mio*-inositol (grupo diretor)**				***D*-manose (grupo diretor)**			
Grupos carbonílicos	C_1	C_2	C_3	C_4	C_1	C_2	C_3	C_4
Carga parcial (u.a.)	0,9920	0,9498	0,9392	1,0746	0,8941	1,0714	1,0447	0,8936

De acordo com as cargas de potencial eletrostático para o modelo com quatro *dendrons* de NFOH e *mio*-inositol (Figura 47), a região que apresentou menor densidade eletrônica foi a carbonila C_4, com o valor de 1,0746 u.a., maior valor em relação aos demais grupos carbonílicos analisados neste estudo (Tabela XI). Entretanto, esta carbonila não apresentou disponibilidade espacial para aproximação enzimática. Neste caso, o grupo carbonílico que tem menor impedimento estérico e, também, apresenta deficiência eletrônica (carga de potencial eletrostático equivalente a 0,9920 u.a.) é a carbonila C_1, que liga o núcleo (*mio*-inositol) ao *dendron* (ácido málico). Considerando todos os resultados, o ponto mais vulnerável para hidrólise enzimática neste modelo foi a C_1 (Figura 51).

Já no sistema com quatro ramificações com *D*-manose, como grupo diretor, o menor impedimento estérico foi observado no grupo carbonílico C_2, pois esta região apresentou maior área disponível. Em adição, os dados de potencial eletrostático,

também, mostraram que este grupo carbonílico tem menor densidade eletrônica (carga de potencial eletrostático de 1,0714 u.a.) (Tabela XI). Portanto, neste modelo a carbonila C_2, próxima ao grupo diretor, é a porção mais suscetível à ruptura (Figura 51).

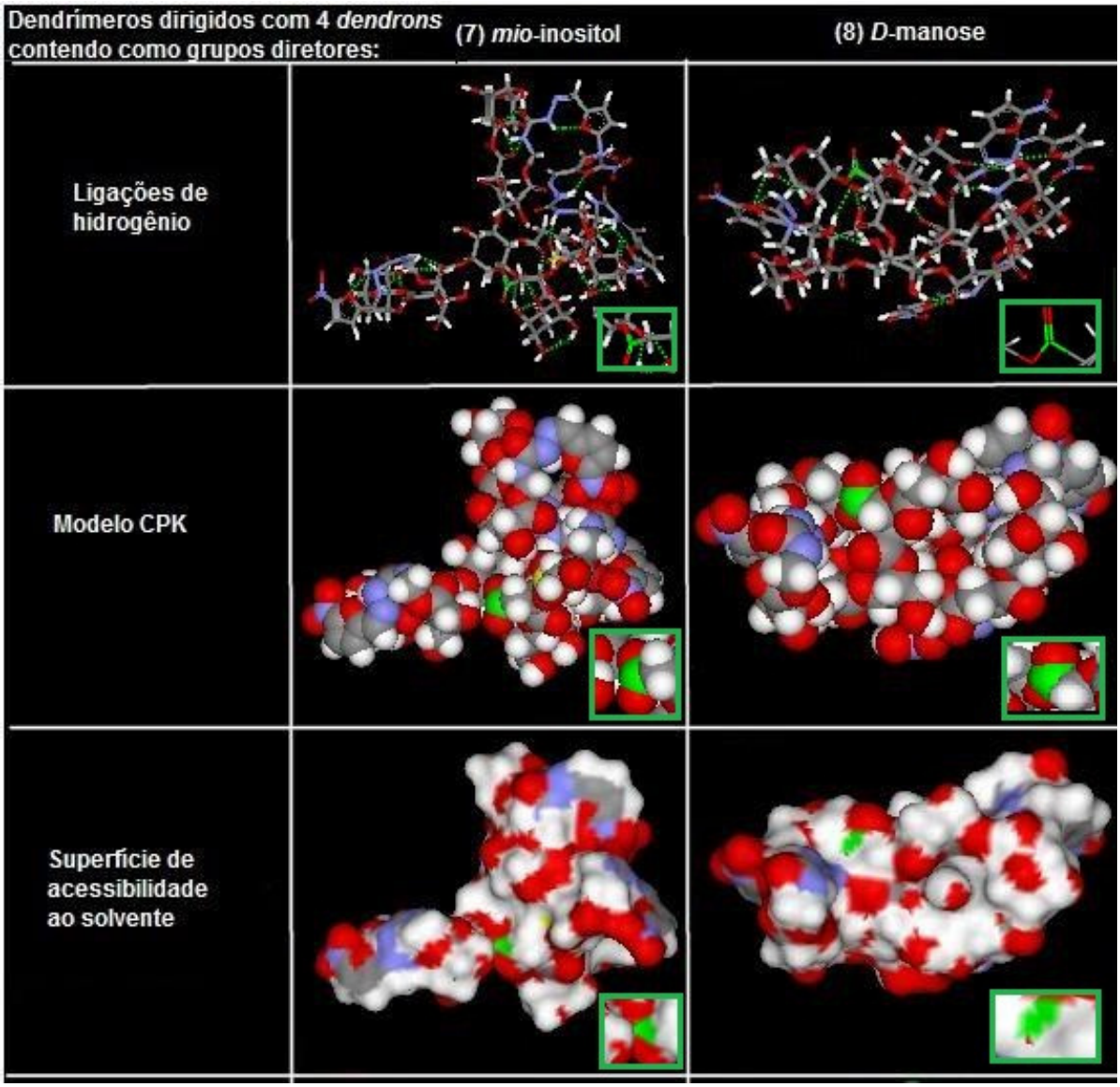


Figura 51: Modelos 3D dos dendrímeros com quatro ramificações de NFOH com *mio*-inositol (7) e NFOH com *D*-manose (8). As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas verdes pontilhadas, modelo CPK e mapa de superfície de acessibilidade ao solvente (MSAS). Esquema de cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), O (vermelho), nitrogênio (azul). Os grupos carbonílicos mais suscetíveis à ação enzimática estão destacados em verde no modelo CPK e no MSAS.

Tabela XII– Valores das cargas atômicas parciais de potencial eletrostático dos dendrímeros constituídos por cinco ramificações de *mio*-inositol e *D*-manose

Dendrímeros	***mio*-inositol (grupo diretor)**				***D*-manose (grupo diretor)**			
Grupos carbonílicos	C_1	C_2	C_3	C_4	C_1	C_2	C_3	C_4
Carga parcial (u.a.)	0,8346	0,7989	0,8199	0,6171	0,6316	0,6681	0,8616	0,7454

Para o modelo contendo o grupo diretor *mio*-inositol, a carbonila C_1 apresentou maior valor de carga de potencial eletrostático, equivalente a 0,8346 u.a., isto revela a maior deficiência eletrônica nesta região (Tabela XII). Entretanto, esta carbonila apresentou impedimento estérico, o que inviabiliza o ataque enzimático. A maior área disponível para aproximação enzimática foi observada na carbonila C_3, que liga os ácidos málicos do composto bioativo e do grupo diretor. Além disso, esta região, também, apresentou deficiência eletrônica (carga de pontecial eletrostático 0,8199 u.a.) (Figura 52).

Para os sistemas contendo cinco ramificações com *D*-manose, como grupo diretor, os resultados de impedimento estérico e de densidade eletrônica (0,8616 u.a.) (Tabela XII) indicam o grupo carbonílico C_3, como a região mais sucetível a ação enzimática (Figura 52).

Portanto, os dendrímeros dirigidos contendo cinco ramificações de ambos os grupos diretores apresentaram como ponto mais favorável à aproximação enzimática a carbonila C_3, região que liga os ácidos málicos do grupo diretor e do composto bioativo.

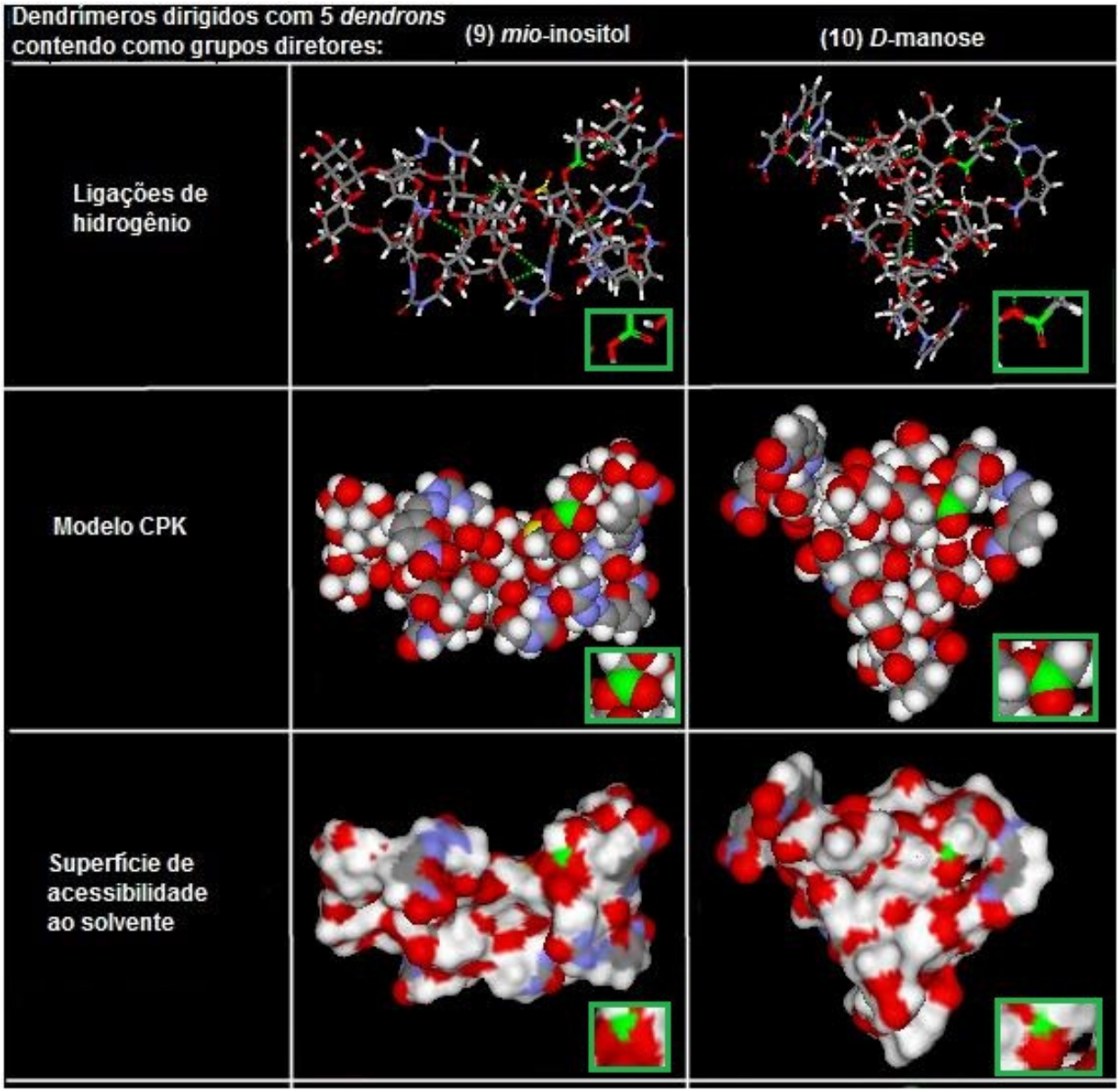


Figura 52: Modelos 3D dos dendrímeros com cinco ramificações de NFOH com *mio*-inositol (9) e NFOH com *D*-manose (10). As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas verdes pontilhadas, modelo CPK e mapa de superfície de acessibilidade ao solvente (MSAS). Esquema de cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), O (vermelho), nitrogênio (azul). Os grupos carbonílicos mais suscetíveis à ação enzimática estão destacados em verde no modelo CPK e no MSAS.

Tabela XIII – Valores das cargas atômicas parciais de potencial eletrostático dos dendrímeros constituídos por seis ramificações de *mio*-inositol e *D*-manose

Dendrímeros	***mio*-inositol (grupo diretor)**				***D*-manose (grupo diretor)**			
Grupos carbonílicos	C_1	C_2	C_3	C_4	C_1	C_2	C_3	C_4
Carga parcial (u.a.)	0,7529	0,6873	0,7433	0,6729	0,7542	0,6922	0,8259	0,7054

De acordo com as cargas de potencial eletrostático, o dendrímero com seis *dendrons* de grupo diretor inositol tem como região com maior deficiência eletrônica a carbonila ligada ao foco central, determinada como C_1. Esta apresentou potencial eletrostático de 0,7529 u.a., maior valor com relação às demais carbonilas analisadas neste estudo (Tabela XIII). Entretanto, no mapa de superfície de acessibilidade ao solvente e no modelo CPK, esta região apresenta grande impedimento estérico, que impossibilita a visualização deste grupo carbonílico. Neste modelo, a carbonila que mostrou maior disponibilidade espacial foi a carbonila C_3. Ademais, esta região, também, apresentou deficiência eletrônica com valor de carga de potencial eletrostático equivalente a 0,7433 u.a (Tabela XIII). Considerando estes resultados, a região mais vulnerável para clivagem enzimática é a carbonila que liga os ácidos málicos do grupo diretor e do composto bioativo (Figura 53).

O modelo com seis *dendrons* contendo *D*-manose apresentou o grupo carbonílico C_3, como o ponto mais suscetível a ataque enzimático, visualizados pelo mapa de superfície de acessibilidade ao solvente e modelo CPK. Além disso, esta região apresentou menor distribuição de densidade eletrônica (carga de potencial eletrostático 0,8259 u.a.) (Tabela XIII), em comparação aos demais grupos carbonílicos avaliados por este trabalho (Figura 53).

Assim sendo, os dendrímeros constituídos por seis ramificações contendo tanto *mio*-inositol quanto *D*-manose como grupos diretores apresentaram o grupo carbonílico C_3, que liga os ácidos málicos do grupo diretor e do composto bioativo, como região mais vulnerável à ação enzimática.

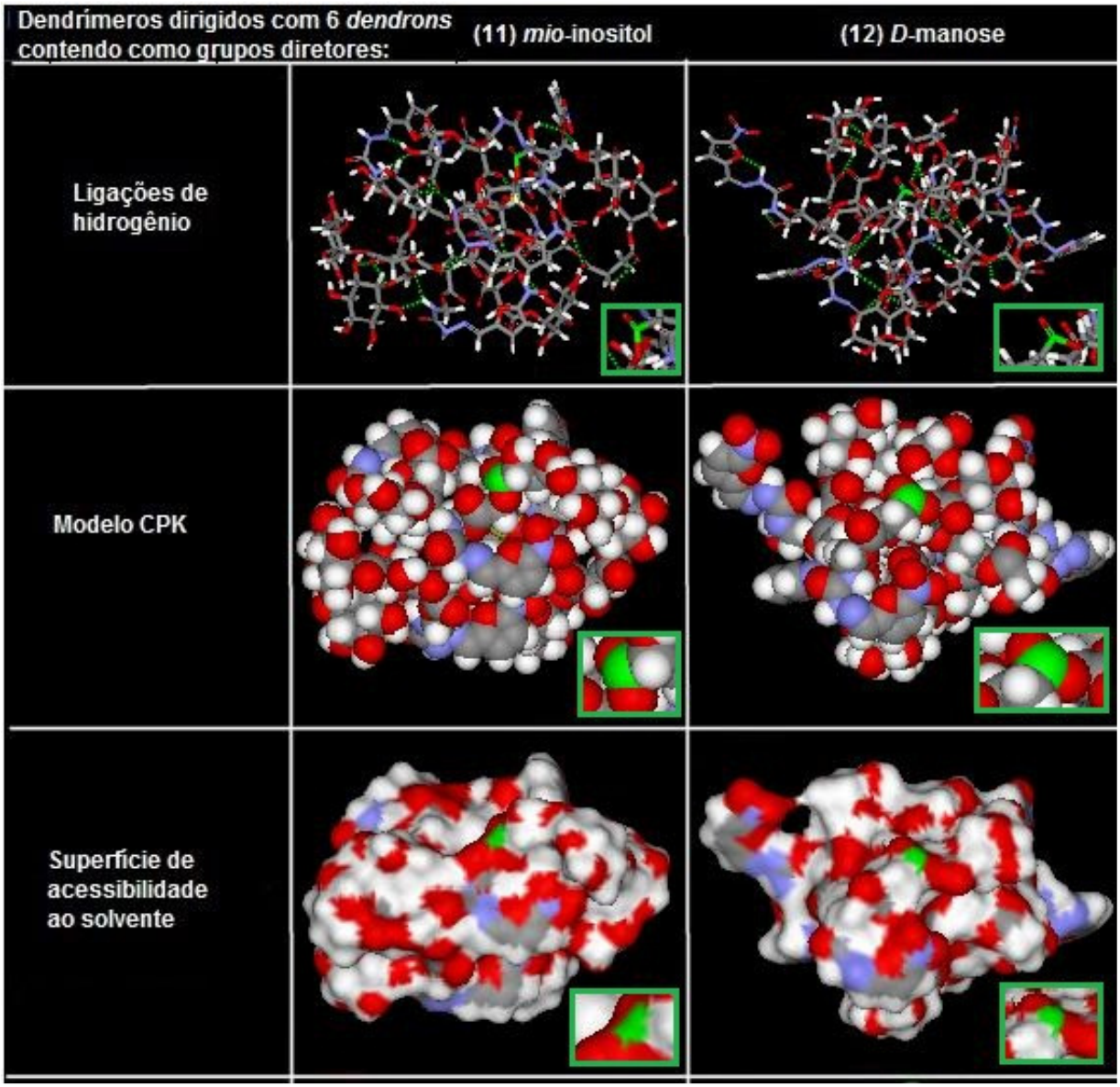


Figura 53: Modelos 3D dos dendrímeros com seis ramificações de NFOH com *mio*-inositol (11) e NFOH com *D*-manose (12). As ligações de hidrogênio estão representadas por linhas verdes pontilhadas, modelo CPK e mapa de superfície de acessibilidade ao solvente (MSAS). Esquema de cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), O (vermelho), nitrogênio (azul). Os grupos carbonílicos mais suscetíveis à ação enzimática estão destacados em verde no modelo CPK e no MSAS.

Os estudos de modelagem auxiliam no planejamento de fármacos e, como observado neste trabalho, permitem a previsão e sugerem o comportamento de fármacos e candidatos a fármacos no metabolismo humano. No entanto, estudo com modelos de esterase devem ser realizados e validados com o estudo da liberação experimental, para que se tenha visão mais acurada a respeito das possibilidades de liberação dos compostos ativos de seus transportadores dendriméricos.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A ciência não está relacionada com a predição, com o futuro, com fazer coisas, mas sim com o explicar. Os cientistas são pessoas que têm o prazer de explicar.

Humberto Maturana

5. CONCLUSÕES

- As análises espectroscópicas dos dendrímeros dirigidos de inositol e de manose, sintetizados com a utilização de dicicloexilcarbodiimida (DCC), sugeriram a obtenção dos compostos desejados, embora muito impuros e sem o composto bioativo (NFOH);

- A síntese do intermediário I com 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) foi bem sucedida, porém a presença de impurezas neste intermediário dificultou a obtenção do composto purificado;

- Possivelmente, obteve-se o intermediário I a partir do método F3 (que utiliza cloreto de tionila);

- As tentativas de otimização da obtenção do intermediário I utilizando cloroformatos como agente condensante (cloroformatos de etila, metila e 4-nitrofenilcloroformato) geraram anidridos mistos estáveis, que não sofreram ataque nucleofílico pelo álcool e, portanto, não levaram à obtenção do intermediário I;

- A síntese do intermediário I utilizando *N*,*N*`-carbonildiimidazol (CDI), como agente condensante, e o método de Fisher para a reação de esterificação não foram bem sucedidos;

- As tentativas de obtenção do intermediário IV, que consiste na ramificação formada pelo ácido málico protegido e NFOH, realizadas pelos métodos G, H e I não levaram a resultados satisfatórios;

- Por meio da modelagem molecular foi possível a análise preliminar do comportamento de liberação dos dendrímeros dirigidos de NFOH e a predição dos prováveis pontos de ruptura frente à ação de esterases inespecíficas.

6. PERSPECTIVAS

⇒ Desenvolver técnicas de purificação eficientes para os intermediários obtidos, bem como para os dendriméros dirigidos de inositol e manose;

⇒ Aprimorar a obtenção do intermediário I com a utilização de cloreto de tionila nestas reações;

⇒ Desenvolver metodologia sintética para os dendrímeros dirigidos de NFOH;

⇒ Realizar estudos de modelagem molecular com a enzima para avaliação do comportamento de liberação dos dendrímeros dirigidos com NFOH;

⇒ Uma vez obtidos os derivados propostos, realizar estudos de liberação enzimática *in vitro*.

REFERÊNCIAS

Bons livros inspiram bons pensamentos.

Winston Churchill

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 mediates amidations. **Organic Letters**, v.12, p.324-327, 2010.

AKILOV, O.E.; KASUBOSKI, R.E.; CARTER, C.R.; McDOWELL, M.A. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. **Journal Leukocyte Biology**, v.81, p.1188-1196, 2007.

ALAKURTTI, S.; HEISKA, T.; KIRIAZIS, A.; SIERRA, N.S.; JAFFE, C.L.; KAUHALUOMA, J.Y. Synthesis and anti-leishmanial activity of heterocyclic betulin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.1573-1582, 2010.

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.

ALMEIDA, M.V.; SILVA, A.D.; SOUZA, M.V.N.; BENÍCIO, A.A.A. Cascata dos fosfoinositídeos. **Química Nova**, v.26, p.105-111, 2003.

AMATO NETO, V.; GRYSCHEK, R.C.B.; AMATO, V.S.; TUON, F.F. **Parasitologia – uma abordagem clínica.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.104–110, 112–115, 118–126.

AMATO, V.S.; TUON, F.F.; SIQUEIRA, A.M.; NICODERNO, A.C.; AMATO NETO, V. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.77, p.266-274, 2007.

AMORA, S.S.A.; BEVILAQUA, C.M.L.; FEIJÓ, F.M.C.; ALVES, N.D.; MACIEL, M.V. Control of phlebotomine (díptera: psychodidae) leishmaniasis vectors. **Neotropical Entomology**, v.38, p.303-310, 2009.

ASTRUC, D.; BOISSELIER, E.; ORNELAS, C. Dendrimers designed for functions: from physical, photophysical, and supramolecular properties to applications in sensing, catalysis, molecular electronics, photonics, and nanomedicine. **Chemical Reviews**, v.110, p.1857-1959, 2010.

BARBOSA, C.F.; OKUDA, E.S.; CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I.; CICARELLI, R.M.B. Rapid test for the evaluation of the activity of the prodrug hydroxymethylnitrofurazone in the processing of *Trypanosoma cruzi* messenger RNAs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.33-39, 2007.

BARREIRO, E.J.; RODRIGUES, C.R. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v.20, p.300-310, 1997.

BARRET, T.; RAVIZZINI, G.; CHOYKE, P.L.; KOBAYASHI, H. Dendrimers applications related to bioimaging. **Engineering in Medicine an Biology Magazine**, v.28, p.12-22, 2009.

BASU, N.; SETT, R.; DAS, P.K. Down-regulation of mannose receptors on macrophages after infection with *Leishmania donovani*. **Biochemical Journal**, v.277, p.451-456, 1991.

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

BODE, M.L.; GATES, P.J.; GEBRETNSAE, S.Y.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation and steroselective total synthesis of pavettamine, the casual agent of gousiekte. **Tetrahedron**, v.66, p.2026-2036, 2010.

BODOR, N. Prodrugs and site-specific chemical delivery systems. **Annual Report in Medicinal Chemistry**, v.22, p.3304-3313, 1987.

BOER, M.D.; ARGAW, D.; JANNIN, J.; ALVAR, J. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, p.1471-1477, 2011.

BREWSTER, M.E.; BODOR, N. Improved brain delivery of antiviral agents through the use of redox targeting. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.14, p.177-197, 1994.

BUNDGAARD, H. **Design of prodrugs**. Amsterdam: Elsevier, 1985. 370p.

BURKERT, U.; ALLINGER, N.L. Molecular mechanics. **American Chemical Society**, v.177, p.59-78, 1982.

CARVALHO, P.B.; RAMOS, D.C.C.; RODEGUERI, F.A.; COTRIM, P.C.; FERREIRA, E.I. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential anti-leishmanial targeted drugs of pyrimethamine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.92, p.2109-2116, 2003.

CAVILLO, S.M.; RUEDA, J.C.V.; MARTINEZ, L.E.F.; CELA, R.G.M.; ÂNGULO, E.E.F. Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, p.1-15, 2010.

CHAKRABORTY, R.; CHAKRABORTY, P.; BASU, M.K. Macrophage mannosyl fucosyl receptor: its role in invasion of virulent and avirulent *L.donovani* promastigotes. **Bioscience Reports**, v.18, p.129-141, 1998.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.873-882, 2007.

CHENG, Y.; ZHAO, L.; LI, Y.; XU, T. Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives. **Chemical Society Reviews**, v.4, p.2673-2703, 2011.

CHRISTIE, W.W. **Advances in Lipid Methodology – Two**. Dundee: The Oily Press, 1993. p.69-111.

CHUNG, S.K.; LEE, W.S.; KIM, B.; IM, J.; GHOSH, S.C. Inositol and trehalose derivatives and pharmaceutical compositions for treating neurodegenerative diseases comprising the same. US Pat. 0224423, 2011.

CHUNG, M.C.; GUIDO, R.V.; MARTINELLI, T.F.; GONÇALVES, M.F.; POLLI, M.C.; BOTELHO, K.C.; VARANDA, E.A.; COLLI, W.; MIRANDA, T.M.; FERREIRA, E.I. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p.4779-4783, 2003.

CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.; CASTRO, L.F.; GÜIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p.155-179, 2005.

CLARK, T. **A handbook of computational chemistry:** a pratical guide to chemical structure and energy calculations. Friedrich: Hardcover, 1985, 352p.

COELHO, A.C.; TOSI, L.R.O.; COTRIM, P.C. Mapping of a *Leishmania* major gene / lócus that confers pentamidine resistance by deletion and insertion of transposable element. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, p.1–4, 2004.

COHEN, N.C. The molecular modeling perspective in drug design. In:____(Ed.). **Guidebook on molecular modeling in drug design**, California: Academic Press, 1996. p.1-17, 60-61.

COTA, G.F.; SOUSA, M.R.; RABELLO, A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV infected patients: a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.19, p.1–8, 2011.

CROFT, S.L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, p.1478–1483, 2011.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, p.111-126, 2006.

DAMEN, E.W.; WIEGERINCK, P.H.; BRAAMER, L.; SPERLING, D.; D.V.D., SCHEEREN, H.W. Paclitaxel esters of malic acid as prodrugs with improved water solubility. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.8, p.427–432, 2000.

DAVIES, C.; CARDOZO, R.M.; NEGRETTE, O.S.; MORA, M.C.; CHUNG, M.C.; BASOMBRIO, M.A. Hydroxymethylnitrofurazone is active in a murine model of Chagas´disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.3584-3589, 2010.

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. WO Pat. 127639, 2007.

DENNY, P.W.; ELDIN, H.S.; PRICE, H.P.; SMITH, D.F.; SCHWARZ, R.T. The protozoan inositol phosphorylceramide synthase: a novel drug target which defines a new class of sphingolipid synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v.281, p.28200-28209, 2006.

DHIMITRUKA, I.; SANTALUCIA, J. Investigation of the Yamaguchi esterification mechanism. Synthesis of a Lux-S enzyme inhibitor using an improved esterification method. **Organic Letters**, v.8, p.47-50, 2006.

DOHERTY, D. **MOLSIM**: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software - User's Guide, version 3.2, The Chem21 Group Inc.: Lake Forest, IL, 1997.

DORIGUETTO, A.C.; SILVA, C.H.T.P.; ELLENA, J.; TROSSINI, G.H.G. ; CHIN, C.M.; FERREIRA, E.I. 5-nitro-2-furaldehyde N-(hydroxymethyl)semicarbazone. **Acta Crystallographica**, v.61, p.2099-2101, 2005.

DREW, M.E.; LANGFORD, C.K.; KLAMO, E.M.; RUSSELL, D.G.; KAVANAUGH, M.P.; LANDFEAR, S.M. Functional expression of a *mio*-Inositol/H Symporter from *Leishmania donovani.* **Molecular and Cellular Biology**, v.15, p.5508-5515, 1995.

DUTHIE, M.S.; RAMAN, V.S.; PIAZZA, F.M.; REED, S.G. The development and clinical evaluation of second generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, v.30, p.134-141, 2012.

EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B.B. *In silico* pharmacology for drug discovery: applications to targets and beyond. **Journal of Pharmacology**, v.152, p.21-37, 2007.

EL-ON, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. **Israel Medical Association Journal**, v.11, p.623-628, 2009.

EMANUELE, A.D.; ATTWOOD, D. Dendrimer-drug interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.2147-2162, 2005.

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

ETTMAYER, P.; AMIDON, G.L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, p.2393-2404, 2004.

FARIA, M.S.; REIS, F.C.G.; PEREIRA, R.L.A.; MORRISON, L.S.; MOTTRAM, J.C.; LIMA, A.P.C.A. *Leishmania* inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages. **Journal of Immunology**, v.186, p.411-422, 2011.

FARIN, D.; AVNIR, D. Surface fractality of dendrimers. **Angewandte Chemie International Edition**, v.30, p.1379-1380, 2001.

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.

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targeted and drugs. **Pharmaceutical Research**, v.28, p.2758-2770, 2011.

FIOCRUZ. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ccs/media/leishmaniose.jpg>. Acesso em: 25/01/2011 às 10h.

FIOCRUZ. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm>. Acesso em: 25/01/2011 às 11h.

FISHER, M.; VÖGTLE, F. Dendrimers: from design to application: a progress report. **Angewandte Chemie International Edition**, v.38, p.884-905, 1999.

FRANÇA, F.F.A.C. **Andrejus Korolkovas Dicionário Terapêutico Guanabara** Ed. 2010/2011. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2010. p.154–160.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R.R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v.14, p.2317-2336, 2009.

FRIIS, G.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U. **A textbook of drug design and development.** 2 ed. Amsterdam: Harwood Academic: 1996, p.351-385.

GACHET, M.S.; LECARO, J.S.; KAISER, M.; BRUN, R.; NAVARRETE, H.; MUÑOZ, R.A.; BAUER, R.; SCHÜNLY, W. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p.184-197, 2010.

GAJBHIYE, V.; PALANIRAJAN, V.K.; TEKADE, R.K.; JAIN, N.K. Dendrimers as therapeutic agents: a systematic review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p.989-1003, 2009.

GAZI, U.; POMARES, L.M. Influence of the mannose receptor in host immune responses. **Immunobiology**, v.214, p.554-561, 2009.

GIAROLLA, J. **Pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofural potencialmente antichagásicos.** Estudo de condições sintéticas para a primeira geração. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007, 155p [Dissertação de Mestrado].

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-hidroxiflavona e quercetina.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012, 183p [Tese de Doutorado].

GIAROLLA, J.; TROSSINI, G.H.G.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I.; MENEZES, C.M.S. **Utilização da modelagem molecular para a escolha do método de síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente antichagásicos**. Anais da 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, São Paulo, 19 de maio a 22 de maio de 2006.

GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; RANDO, D.G.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling study on the disassembly of dendrimers designed as potential antichagasic and antileishmanial prodrugs. **Journal of Molecular Modeling**, v.18, p.2257-2269, 2012.

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.

GONÇALVES, M.F.; CHUNG, M.C.; COLLI, W.; MIRANDA, M.T.M.; FERREIRA, E.I. Efeito da associação de nitrofurazona e primaquina em células LLC-MK2 infectadas com formas promastigotas de *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.27, p.164, 1994.

GONZÁLEZ, U; PINART, M.; REVEIZ, L.; PARDO, M.R.; TWEED, J.; MACAYA, A.; ALVAR, J. Designing and reporting clinical trials on treatments for cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.51, p.409-419, 2010.

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

GREEN, D.L.C.; KIDDLE, J.J.; THOMPSON, C.M. Stereochemistry of remote dianion addition to imines. Application to the synthesis of (1S, 8aS)-1-hydroxyindolizidine. **Tetrahedron**, v.51, p.2865–2874, 1995.

GUIDO, R.V.C.; FERREIRA, E.I.; NASSUTE, J.C.; VARANDA, E.A.; CHUNG, M.C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofural (nitrofurazona). **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.22, p.307-318, 2001.

HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v.27, p.403-409, 2011.

HENKEL, J.G.; BILLINGS, E.M. Molecular modeling. In: FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. (Eds.). **Principles of medicinal chemistry**. 4th. ed., Media: Williams & Wilkins, 1995. p.57-58.

HIRAKU, Y.; SEKINE, A.; NABESHI, H.; MIDORIKAWA, K.; MURATA, M.; KUMAGAI, Y.; KAWANISHI, S. Mechanism of carcinogenesis induced by a veterinary antimicrobial drug, nitrofurazone, via oxidative DNA damage and cell proliferation. **Cancer Letters**, v.215, p.141-150, 2004.

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

HOTEZ, P.J.; SAVIOLI, L.; FENWICK, A. Neglected tropical diseases of the Middle East and North Africa: review of their prevalence, distribution, opportunities for control. PLOS **Neglected tropical diseases**, v.6, p.1-8, 2012.

HSU, F.F.TURKA, J.;ZHANG, K.BEVERLEY, S.M. Characterization of inositol phosphorlceramides from *Leishmania major* by tandem mass spectrometry with electrospray ionization. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.18, 1591-1604, 2007.

HUSSAIN, M.A.; LIEBERT, T.; HEINZE, T. Acylation of cellulose with N,N´carbonyldiimidazole-activated acids in the novel solvent dimethylsulfoxide/tetrabutylammonium fluoride. **Macromolecular Rapid Communications**, v.25, p.916-920, 2004.

HUTTUNEN, K.M.; RAUNIO, H.; RAUTIO, J. Prodrugs – from serendipity to rational design. **Pharmacological reviews**, v.63, p.750-771, 2011.

JAIN, K.; KESHARWANI, P.; GUPTA, U.; JAIN, N.K. Dendrimer toxicity: Let´s meet the challenge. **International Journal of Pharmaceutics**, v.394, p.122-142, 2010.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J.D. **Imunobiologia** – O sistema imunológico na saúde e na doença. 4 ed. Porto Alegre: Artes médicas, 2000. p.373-374, 572.

JESUS, A.M.R. **Dendrímeros e suas aplicações.** Lisboa: Universidade de Nova Lisboa, 2003. Disponível em: <http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos2003%20PDF/Alexandre%20Jesus.pdf>. Acesso em: 12/10/2009 às 15h.

JONG, S.J.; SMEDT, S.C.; DEMEESTER, J.; VAN NOSTRUM, C.F.; KETTENESVAN, J.J.B.; HENNINK, W.E. Biodegradable hydrogels based on stereocomplex formation between lactic acid oligomers grafted to dextran. **Journal of Controlled Release**, v.72, p.47-56, 2001.

KAKWANI, M.D.; SURYAVANSHI, P.; RAY, M.; RAJAN, M.G.; MAJEE, S.; SAMAD, A.; DEVARAJAN, P.; DEGANI, M.S. Design, synthesis and antimycobacterial activity of cinnamide derivatives: a molecular hybridization approach. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v.21, p.1997-1999, 2011.

KAMINSKAS, L.M.; BOYD, B.J.; PORTER, C.J.H. Dendrimer pharmacokinetics: the effect of size, structure and surface characteristics on ADME properties. **Nanomedicine**, v.6, p.1063-1084, 2011.

KAMINSKAS, L.M.; McLEOD, V.M.; PORTER, C.J.H.; BOYD, B.J. Association of chemotherapeutic drugs with dendrimer nanocarriers: an assessment of the merits of covalent conjugation compared to noncovalent encapsulation. **Molecular Pharmaceutics**, v.9, p.355-373, 2012.

KANESHIRO, E.S.; JAYASIMHULU, K.; LESTER, R.L. Characterization of inositol lipids from *Leishmania donovani* promastigotes: identification of an inositol sphingophospholipid. **Journal of Lipid Research**, v.27, p.1294-1303, 1986.

KHANDARE, J.; CALDERO, M.; DAGIA, N.M.; HAAG, R. Multifunctional dendritic polymers in nanomedicine: opportunities and challenges. **Chemical Society Reviews**, v.41, p.2824-2848, 2012.

KLAJNERT, B.; BRYSZEWSKA, M. Dendrimers: properties and applications. **Acta Biochimica Polonica**, v.48, p.199-208, 2001.

KOHL, M. THUNUS, L.; LEJEUNE, R. Synthesis of 17β-hydroxy esters of 4-estren-17β-ol-3-one and carbenicillin, ticarcillin, or functionalized oxacillin: potentially useful conjugates for β-lactamase-based homogeneous immunoassays. **Bioconjugate Chemistry**, v.8, p.772-779, 1997.

KOROLKOVAS, A. **Essentials of medicinal chemistry.** New York: Wiley-Interscience, 2 ed. 1988. 1204p.

LA-SCALEA, M.A.; CHUNG, M.C.; CRUZ, M.L.; SERRANO, S.H.P.; FERREIRA, E.I. Dissociation and electrooxidation of primaquine diphosphate as na approach to the study of anti-chagas prodrugs mechanism of action. **Bioeletrochemistry**, v.9, p.53-55, 2001.

LACKOVIC, K.; PARISOT, J.O.; SLEEBS, N.; BAELL, J.B.; DEBIEN, L.; WATSON, K.G.; CURTIS, J.M.; HANDMAN, E.; STREET, I.P.; KEDZIERSKI, L. Inhibitors of *Leishmania* GDP-mannose pyrophosphorylase identified by high-throughput screening of small-molecule chemical library. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.1712-1719, 2010.

LINDOSO, J.A.L.; LINDOSO, A.A.B.P. Neglected tropical diseases in Brazil**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v.51, p.247-253, 2009.

LIPKOWITZ, K.B.; BOYD, D.B. **Reviews in computational chemistry.** New York: VCH Pub, v.1, 1990. 440p.

LIU, M.; FRÉCHET, J.M.J. Designing dendrimers for drug delivery. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v.2, p.393-401, 1999.

MA, D.L.; CHAN, D.S.H.; LEE, P.; KWAN, M.H.T.; LEUNG, C.H. Molecular modeling of drug - DNA interactions: virtual screening to structure-based design. **Biochemie**, v.93, p.1252-1266, 2011.

MACHADO, C.M.; MARTINS, T.C.; COLTURATO, I.; LEITE, M.S.; SIMIONE, A.J.; SOUZA, M.P.; MAUAD, M.A.; COLTURATO, V.R. Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of Brazilian HSCT center. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.51, p.309-324, 2009.

MALTEZOU, H.C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, p.1-8, 2010.

MARKELL, E.K.; JOHN, D.T.; KROTOSKI, W.A. **Parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.136–149.

MARZOCHI, M.C.A.; FAGUNDES, A.; ANDRADE, M.V.; SOUZA, M.B.; MADEIRA, M.F.; CONFORT, E.M.; SCHUBACH, A.O.; MARZOCHI, K.B.F. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.570-580, 2009.

MAURER, M.; DONDJI, B.; STEBUT, E.V. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v.198, p.137-146, 2009.

MAYRINK, W.; BOTELHO, A.C.C.; MAGALHÃES, P.A.; BATISTA, S.M.; LIMA, A.O.; GENARO, O.; COTA, C.A.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; CAIAFFA, W.T.; NASCIMENTO, E.; COELHO, G.L.L.M. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, v.39, p.1–16, 2006.

McCARTHY, T.D.; KARELLAS, P.; HENDERSON, S.A.; GIANNIS, M.; O'KEEFE, D.F.; HEERY, G.; PAULL, J.R.A.; MATTHEWS, B.R.; HOLAN, G. Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention. **Molecular Pharmaceutics**, v.2, p.312-318, 2005.

McCONVILLE, M.J.; FERGUSON, M.A.J. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **Biochemical Journal**, v.294, p.305-324, 1993.

McNERNY, D.Q.; LEROEIL, P.R.; BAKER, J.R. Understanding specific and nonspecific toxicities: a requirement for the development of dendrimer-based pharmaceuticals. **Advanced Reviews**, v.2, p.249-259, 2010.

MEDINA, S.H.; SAYED, M.E.H. Dendrimers as carriers for delivery of chemotherapeutic agents. **Chemical Reviews**, v.109, p.3141-3157, 2009.

MINTZER, M.A.; GRINSTAFF, M.W. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. **Chemical Society Reviews**, v.40, p.173-190, 2011.

MONTANARI, M.L.C.; MONTANARI, C.A.; VELOSO, D.P. Sistemas transportadores de drogas. **Química Nova**, v.21, p.470–476, 1998.

MORISAKI, K.; OZAKI, S. Syntheses of novel hybrid vitamin C derivatives: stability and biological activity. **ChemInform**, v.27, p.12-16, 1996.

MÜLLER, C.E. Prodrug approaches for enhancing the bioavailability of drugs with low solubility. **Chemistry e Biodiversity**, v.6, p.2071-2083, 2009.

MURRAY, H.W. Review: Leishmaniasis in the United States: treatment in 2012. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, v.86, p.434-440, 2012.

NADENDLA, R.R. Molecular modeling: a powerful tool for drug design and molecular docking. **Resonance**, v.5, p.51-60, 2004.

NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. **International Immunopharmacology**, v.11, p.1464-1488, 2011.

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.

PAHO (ORGANIZACIÓN PANAMERICAN A DE LA SALUD). Disponível em: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/leish-fotos2.htm>. Acesso em: 25/01/2011 às 13h.

PAILA, Y.D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, A. Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.399, p.429-433, 2010.

PALUMBO, E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.2-4, 2008.

PATRICK, G.L. Computer in medicinal chemistry, In____(Ed.). **An introduction to medicinal chemistry**. New York: Oxford, 2008. p.163-184.

PERKEL, J.M. The ups and downs of nanobiotech. **The scientist**, v.18, p.14, 2004.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.5, p.447-451, 2001.

PINTO, M.M.M.; CIDADE, .M.M. **Analysis of racemic ibuprofen and (*S*)-ibuprofen for the formation of diastereoisomeric derivatives.** Porto: Univerisidade do Porto, 2003. Disponível em: < http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-I10.pdf> Acesso em: 03/01/2011 às 15h.

PITALUGA, A.N.; BETEILLE, V.; LOBO, A.R.; ORTIGÃO, J.R.F.; DÁVILLA, A.M.; SOUZA, A.A.; RAMALHO, J.M.O.; TRAUB, Y.M.C. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. **Molecular Genetics and Genomics**, v.282, p.307–317, 2009.

POMARES, L, M.; WIENKE, D.; STILLION, R.; McKENZIE, E.J.; ARNOLD, J.N.; HARRIS, J.; McGREAL, E.; SIM, R.B.; ISACKE, C.M.; GORDON, S. Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor. **European Journal of Immunology**, v.36, p.1074–1082, 2006.

PREVIATO, J.O.; PREVIATO, L.M.; JONES, C.; WAIT, R.; FOURNET, B. Structural characterization of a novel class of glycophosphosphingolipids from the protozoan *Leptomonas samueli*. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, p.24279-24286, 1992.

PROKAI, L.; PROKAI-TATRAI, K.; BODOR, N. Targeting drugs to the brain by redox chemical delivery systems. **Medicinal Research Reviews**, v.20, p.367-416, 2000.

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

QIU, L.Y.; BAE, Y.H. Polymer Architecture and Drug Delivery. **Pharmaceutical Research**, v.23, p.1-30, 2005.

RANG, W.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Drogas antiprotozoários. In:____(Eds). **Farmacologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.610, 619 e 620.

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.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v.7, p.581-596, 2007.

REY, L. Leishmania e Leishmaníases. In:____(Ed.). **Parasitologia** – Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.138-139, 214-245, 253-265.

REYMOND, J.L.; DARBRE, T. Peptide and glycopeptides dendrimers apple trees as enzyme models and for biomedical applications. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v.10, p.1483-1492, 2012.

REYNOLDS, T.B. Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it. **Microbiology**, v.155, p.1386-1396, 2009.

ROMERO, G.A.S.; BOELAERT, N. Control of visceral leishmaniasis in Latin America – A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.4, p.584-601, 2010.

ROMERO, E.L.; MORILLA, M.J. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. **Expert Opinion Drug Delivery**, v.5, p.805-823, 2008.

ROSKAMP, L.; PEGORARO, M.; LUZ, P.R.; CRESTANI, S.; VAZ, R.S. Uma revisão sobre receptores opsônicos e não opsônicos. **Revista da Universidade Positivo Biologia & Saúde (RUBS)**, v.1, p.12-16, 2005.

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, D.O.; COUTINHO, C.E.R.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; REAL, S.C.; PINHO, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v.103, p.1-10, 2008.

SANTOS, K.S.C.R. **Latenciação de hidroximetilnitrofural com derivados de quitosana, potencialmente ativos em leishmaniose e doença de Chagas**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005, 234p [Tese de Doutorado].

SANTOS, K.S.C.R.; KANASHIRO, E.H.Y.; AOKI, J.I.; COTRIM, P.C.; FERREIRA, E.I. **Estudo preliminar da atividade leishmanicida do hidroximetilnitrofural**. Anais do XI ENCONTRO NACIONAL DE PROFESSORES DE QUÍMICA FARMACÊUTICA, Pernambuco, 30 de setembo a 2 de outubro de 2010.

SCHACHT, E.H.; DE WINNE, K.; HOSTE, K.; VANSTEENKISTE, S. Macromolecular carries for drug targeting. In: WERMUTH, C.G., **The practice of medicinal chemistry**. 2 ed. London: Academic Press, 2003. p.587-600.

SCHRIEFER, A.; WILSON, M.E.; CARVALHO, E.M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.21, p.483-488, 2008.

SEBESTIK, J.; NIEDERHAFNER, P.; JEZEK. J. Peptide and glycopeptides dendrimers and analogous dendrimeric structures and their biomedical applications. **Amino Acids**, v.40, p.301-370, 2011.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of leishmaniasis. **Phytomedicine**, v.18, p.1056-1069, 2011.

SERVICE, M.W.; ASHFORD, R.W.; CALISHER, C.H.; ELDRIDGE, B.F.; JONES, T.W.; WYATT, G. **Encyclopedia of Anthropod transmitted infections**. Cambridge: C.A.B. I. 2006. p.269–279.

SEYFANG, A.; LANDFEAR, S.M. Four conserved cytoplasmic sequence motifs are important for transport function of the *Leishmania* inositol/H^+ symporter. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.5687-5693, 2000.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, v.45, p.255-272, 2008.

SHASTINA, N.S.; TUCHNAYA, O.A.; EINISMAN, L.I.; KASHIRICHEVA, I.I.; STEPANOV, A.E.; YURKEVICH, A.M.; SHVETS, V.I. Asymmetrically substituted *myo*-inositol. The synthesis of conjugate of 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine with phosphatidylinositol: a new nucleoside phospholipid with potential anti-HIV activity. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v.29, p.267-273, 2003.

SHEN, M. SHI, X. Dendrimer-based organic/inorganic hybrid nanoparticles in biomedical applications. **Nanoscale**, v.2, p.1596-1610, 2010.

SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GUIDO, R.V.C.; CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. Advances in prodrug design. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry,** v.5, p.893-914, 2005.

SIMPLÍCIO, A.L.; CLANCY, J.M.; GILMER, J.F.Prodrugs for amines. **Molecules**, v.13, p.519-547, 2008.

SINGER, A.U.; SKARINA, T.; ONOPRIYENKO, O.; EDWARDS, A.M.; ANDERSON, W.F.; SAVCHENKO, A. Structure of IDP00107, a potential *N*-acetyl-gamma-glutamylphosphate reductase from Shigella flexneri. 2009. Disponível em: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3DR3>. Acesso em 25/07/2010 às 9h.

SINGH, G.; SHARMA, P.D. Mutual prodrugs – a recent trend in prodrug design. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences**, v.56, p.69-79, 1994.

SMITH, T.K.; MILNE, F.C.; SHARMA, D.K.; CROSSMAN, A.; BRIMACOMBE, J.S.; FERGUSON, M.A.J. Early steps in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania major*. **Biochemical Journal**, v.326, p.393-400, 1997.

SOUSA, C.B.P.; DAY, M.J. The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites e Vectors**, v.4, p.197-207, 2011.

SOUZA, A.S.; GIUDICE, A.; PEREIRA, J.M.B.; GUIMARÃES, L.H.; JESUS, A.R.; MOURA, T.R.; WILSON, M.E.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. Resistance of *Leishmania* (*viannia*) *braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-α production. **BMC Infectious Diseases**, v.209, n.10, p.1-11, 2010.

STELLA, V.J.; NTI-ADDAE, K.W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.677-694, 2007.

STENTA, M.; PERARO, M.D. An introduction to quantum chemical methods applied to drug design. **Frontiers in Bioscience**, v.E3, p.1061-1078, 2011.

SUCRE, A.P.; CAMPOS, Y.; VÁSQUEZ, J.; MOLL, H.; LEÓN, A.M. Sensitivy os *Leishmania* spp. To Glibenclamide and 4-Aminopiridine: a tool for the study of drug resistance development. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, p.601–606, 1997.

SUNDARAMOORTHY, M.; GOLD, M.H.; POULOS, T.L. Ultrahigh resolution structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: implications for the catalytic mechanism. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.104, p.683-690, 2010.

SUTTERWALA, S.S.; CRESWELL, C.H.; SANYAL, S.; MENON, A.K.; BANGS, J.D. De novo sphingolipid synthesis is essential for viability, but not for transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins, in african trypanosomes. **Eukaryotic Cell**, v.6, p.454-464, 2007.

SUTTERWALA, S.S.; HSU, F.F.; SEVOVA, E.S.; SCHWARTZ, K.J.; ZHANG, K.; KEY, P.; TURK, J.; BEVERLEY, S.M.; BANGS, J.D. Developmentally regulated sphingolipid synthesis in African trypanosomes. **Molecular Microbiology**, v.70, p.281-296, 2008.

SUZUKI, E.; TANAKA, A.K.; TOLEDO, M.S.; LEVERY, S.B.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K. Trypanosomatid and fungal glycolipids and sphingolipids as infectivity factors and potential targets for development of new therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1780, p.362-369, 2008.

SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.71, p.445-462, 2009.

TACHADO, S.D.; TABRIZI, R.M.; SCHOFIELD, L. Specificity in signal transduction among glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. **Parasite Immunology**, v.21, p.609-617, 1999.

TAKAKURA, Y.; HASHIDA, M. Macromolecular drug carrier systems in câncer chemotherapy: macromolecular prodrugs. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.18, p.207-231, 1995.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos.** São Paulo: Atheneu, 2001. 992p.

TAYLOR, P.R.; GORDON, S.; POMARES, L.M. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. **Trends in Immunology**, v.26, p.104–110, 2005.

TEMPONE, A.G.; MORTARA, R.A.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; REIMÃO, J.Q. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.36, p.159-163, 2010.

TEMPONE, A.G.; PEREZ, D.; RATH, S.; VILARINHO, A.L.; MORTARA, R.A.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.A. Targeting *Leishmania* (L.) *chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.60-68, 2004.

TESTA, B. Prodrugs research: fertile or futile. **Biochemical Pharmacology,** v.68, p.2097-2106, 2004.

TESTA, B. Drug metabolism for the perplexed medicinal chemist. **Chemistry e biodiversity**, v.6, p.2055-2070, 2009a.

TESTA, B. Prodrugs: bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.13, p.338-344, 2009b.

TESTA, B.; CALDWELL, J. Prodrugs revisited: the “ah doc” approach as a complement to ligand design. **Medicinal Research Reviews**, v.16, p.233-241, 1996.

TESTA, B.; KRÄMER, S.D. The biochemistry of drug metabolism – An introduction. **Chemistry and biodiversity**, v.6, p.591-684, 2009.

TIUMAN, T.S.; SANTOS, A.O.; NAKAMURA, T.U.; FILHO DIAS, B.P.; NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v.15, p.525-532, 2011.

TOKARSKI, J.S.; HOPFINGER, A.J. Constructing protein models for ligand-receptor binding thermodynamic simulations: an application to a set of peptidometic 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: starbust dendritic macromolecules. **Polymer Journal**, v.17, p.117-132, 1985.

TRACY, J.W.; WEBSTER, L. I. Fármacos usados na quimioterapia das infecções por protozoários. In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P**. Goodman & Gilman:** As bases farmacológicas da terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2003. p.825, 826, 831-838.

TROSSINI, G.H.G.; MALVEZZI, A.; AMARAL.; A.T.; YAGUI, C.O.R.; IZIDORO, M.A.; CEZARI, M.H.S.; JULIANO, L.; CHUNG, M.C.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.25, p.62-67, 2010a.

TROSSINI, G.H.G.; GIAROLLA, J.; REZENDE, L.; AMARAL, A.T.; ZAIM, M.H.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, E.I. Synthesis optimization of hydroxymethylnitrofurazone, an antichagasic candidate, using 32 factorial design. **Letters in Organic Chemistry**, v.7, p.191-195, 2010b.

TUKULULA, M. **The design and synthesis of novel HIV-1 protease inhibitors.** Rhodes University, South Africa, 2009, 158p [Dissertação de Mestrado].

TULADHAR, R.; NATARAJAN, G.; SATOSKAR, A.R. Role of co-stimulation in leishmaniasis. **International Journal of Biological Sciences**, v.97, p.1382-1390, 2011.

UENO, N.; BRATT, C.L.; RODRIGUEZ, N.E.; WILSON, M.E. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum chagasi* promastigotes. **Cellular microbiology**, v.11, p.1827-1841, 2009.

VARGAS, F. **Síntese e aplicação de β-calcogeno amidas quirais em alquilações alílicas assimétricas.** Universidade de Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007, 188p [Tese de Doutorado].

VELOZO, D.; CABRAL, A.; RIBEIRO, M.C.M.; MOTTA, J.O.C.; COSTA, I.M.C.; SAMPAIO, R.N.R. Leishmaniose mucosa fatal em criança. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, p.255-259, 2006.

VERMA, A.; VERMA, B.; PRAJAPATI, S.K.; TRIPATHI, K. Prodrug as a chemical delivery system: a review. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v.2, p.100-103, 2009.

WEINHART, U.; THOMAS, J.R.; PAK, Y.; THOMPSON, G.A.; FERGUSON, M.A.J. Structural characterization of a novel glycosyl-phosphatidylinositol from the protozoan *Tetraymena mimbres*. **Biochemical Journa**l, v.279, p.605-608, 1991.

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

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In:_____(Ed.). **The practice of medicinal chemistry**. London: Academic Press, 2008. p.571-586.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2012. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 18/07/2012 às 9ha.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2012. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2>. Acesso em: 18/07/2012 às 14hb.

YAO, C. Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? **Infection and Immunity**, v.78, p.22-31, 2010.

YONEYAMA, K.A.G.; TANAKA, A.K.; SILVEIRA, T.G.V.; TAKAHASHI, H.K.; STRAUS, A.H. Characterization of *Leishmania* (*viannia*) *braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. **Journal of Lipid Research**, v.47, p.2171-2178, 2006.

ZHANG, K.; SHOWALTER, M.; REVOLTO, J.; HSU, F.F.; TURK, J.; BEVERLY, S.M. Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in *Leishmania*. **European Molecular Biology Organization Journal**, v.22, p.6016-6026, 2003.

ZHANG, S.; KIM, C.C.; BATRA, S.; McKERROW, J.H.; LOKE, P. Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and ctokines. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.4, p.648-669, 2010.

APÊNDICE A

Trabalho desenvolvido em paralelo ao trabalho de mestrado.

A.1 INTRODUÇÃO

Com base nos estudos desenvolvidos e na metodologia empregada, procedeu-se à síntese de dendrímeros dirigidos com outros derivados bioativos em *Leishmania sp.*, a 3-hidroxiflavona e a quercetina. Para esta última foi, também, realizada a abordagem de liberação por modelagem molecular. Ademais, tentou-se a utilização de novos centros, mais simples, dos dendrímeros com vistas ao controle maior da substituição dos dendrons.

Estruturalmente, os flavonódes são compostos fenólicos, com 15 átomos de carbono em sua estrutura básica, dois anéis fenil – A e B ligados por um anel pirano (Figura A.1). A forma glicosídica permite melhor absorção intestinal e biodisponibilidade destes compostos. Representam uma das maiores e diversificadas classes de metabólitos secundários de plantas, presentes em vegetais, frutas e bebidas, portanto, são importantes componentes da dieta diária (LOPES *et al.*, 2000; TASDEMIR *et al.,* 2006).

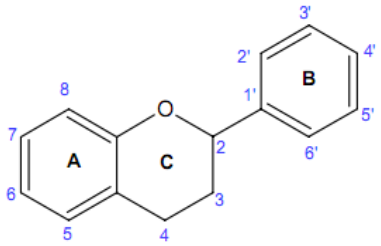


Figura A.1: Estrutura base dos flavonóides.

Os flavonóides são conhecidos por apresentarem muitas propriedades benéficas à saúde humana, por conta das interações com alvos celulares. Muitos destes compostos apresentam atividades antioxidantes, antirradicais livres, antiinflamatórias, antivirais e anticancerígenas (PIETRO *et al.*, 2002).

O parasita *Leishmania* apresenta em sua superfície uma proteína de membrana, que foi identificada como transportador intracelular de ferro (LIT1). Esta desempenha papel importante no transporte de ferro para os parasitas, essencial para a replicação destes dentro dos macrófagos. Estudos sugerem que limitar o acesso do protozoário ao ferro é uma estratégia que inibe o processo evolutivo de *Leishmania*. A redução de ferro, proveniente de fontes externas, promove defeito na via de biossíntese do grupo heme, importante para o crescimento e a multiplicação do parasita. Estudos *in vitro* com quercetina indicaram a interação desta com íons metálicos por ligação de hidrogênio, demonstrando forte afinidade com o ferro. A

quelação do ferro tem sido aventada como ferramenta útil no controle da leishmaniose em condições *in vitro*. Estudos demonstraram atenuação do crescimento de promastigotas com o uso de agentes quelantes, como a quercetina. Este flavonóide apresentou promissora e potente atividade leishmanicida *in vitro* com mínima ou nenhuma citotoxicidade (TASDEMIR *et al.*, 2006; SEN *et al.*, 2008, 2005).

Tasdemir e colaboradores (2006) avaliaram a atividade leishmanicida de uma série de flavonóides. Os compostos 3-hidroxiflavona e quercetina (Figura A.2) apresentaram os valores de IC_{50} de 2,94 e 3,30 μM, respectivamente, quase comparáveis com o padrão miltefosina, IC_{50} de 2,72 μM.

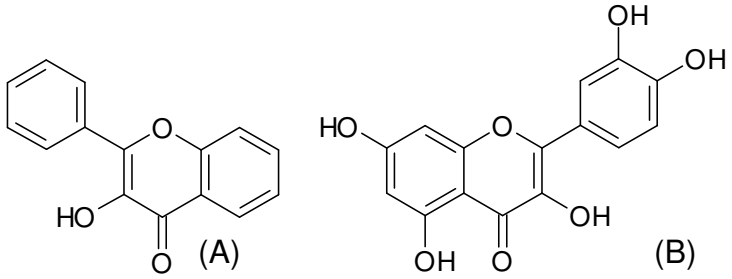


Figura A.2: Estrutura de (A) 3-hidroxiflavona e (B) quercetina.

No entanto, estes compostos apresentam baixa biodisponibilidade, o que indica a necessidade de desenvolvimento de sistemas de transporte para os mesmos. É extremamente necessária a otimização de transportadores e sistemas de distribuição de fármacos (por exemplo, com o uso de dendrímeros e lipossomas) para melhorar a biodisponibilidade e a atividade antiparasitária *in vivo* de flavonóides (3-hidroxiflavona e quercetina) e reduzir o risco de efeitos adversos (TASDEMIR *et al.*, 2006). Portanto, evidências mostram que compostos polifenólicos são potenciais candidatos e apresentam promissora atividade para o tratamento de leishmaniose.

Como novos centros do dendrímero, tentaram-se a etilenodiamina, o etilenoglicol e o glicerol.

⇒ *Etilenodiamina*

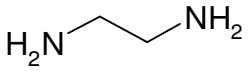


Figura A.3: Estrutura da etilenodiamina.

Também conhecida como 1,2-diaminoetano e 1,2-etanodiamina (Figura A.3), tem fórmula molecular $C_2H_8N_2$ e massa molar de 60,10 g. Trata-se de substância largamente utilizada na indústria farmacêutica para a síntese de fármacos, por sua natureza bifuncional. Na síntese de dendrímeros é centro dos derivados de PAMAM (Poliamidoamina) (TOMALIA *et al.*, 1985).

⇒ Etilenoglicol

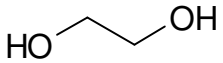


Figura A.4: Estrutura do etilenoglicol.

É um diol e, de acordo com a IUPAC é denominado 1,2-etanodiol (Figura A.4). Consiste em substância amplamente utilizada pela indústria farmacêutica na síntese de fármacos (MORRISON, 1994).

⇒ Glicerol

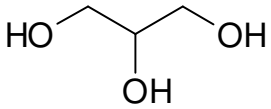


Figura A.5: Estrutura do glicerol.

Descoberto por Scheele, em 1779, é, também, conhecido como 1,2,3-propanotriol (Figura A.5). Atualmente, o glicerol tem ampla aplicação industrial, inclusive na indústria farmacêutica. Esta substância não apresenta toxicidade, uma vez que é importante intermediário no metabolismo dos organismos vivos, como fonte de carbono e de energia, sendo encontrado na forma combinada com glicerídeos em animais. O glicerol participa de muitos processos industriais com atuação nas indústrias: alimentícias, farmacêuticas, química e têxtil (MORRISON, 1994; ARRUDA, RODRIGUES, FELIPE, 2007).

A.2 OBJETIVOS

A.2.1 Busca de novos focos centrais

Na busca de novos focos centrais para a síntese de novos dendrímeros, utilizaram-se como possíveis núcleos para os novos dendrímeros as seguintes substâncias: etilenodiamina, etilenoglicol e glicerol. Estes compostos foram utilizados, devido às dificuldades sintéticas observadas com o inositol como núcleo para os dendrímeros.

Estes focos centrais são polifuncionais, o que permite a formação do dendrímero. No entanto, estas substâncias apresentam menor número de grupos funcionais (dois para etilenodiamina e etilenoglicol, e três para o glicerol) e, desta forma, promovem maior controle do número de substituições, em relação à síntese com o uso de *mio*-inositol, como núcleo.

Outro ponto importante com relação a estes focos centrais é a posição dos grupos funcionais, em que se observa menor impedimento estérico, o que facilitaria a substituição dos dendrons. Além disso, para a etilenodiamina, a ligação amida formada pela amina da etilenodiamina e o ácido carboxílico de ácido málico protegido é mais estável à hidrólise do que a ligação éster, permitindo maior controle na liberação. Ademais, direciona a clivagem para os *dendrons* que são constituídos por ésteres formados entre o ácido málico e o composto bioativo (D´EMANUELE, ATTWOOD, 2005) (Figura A.6).

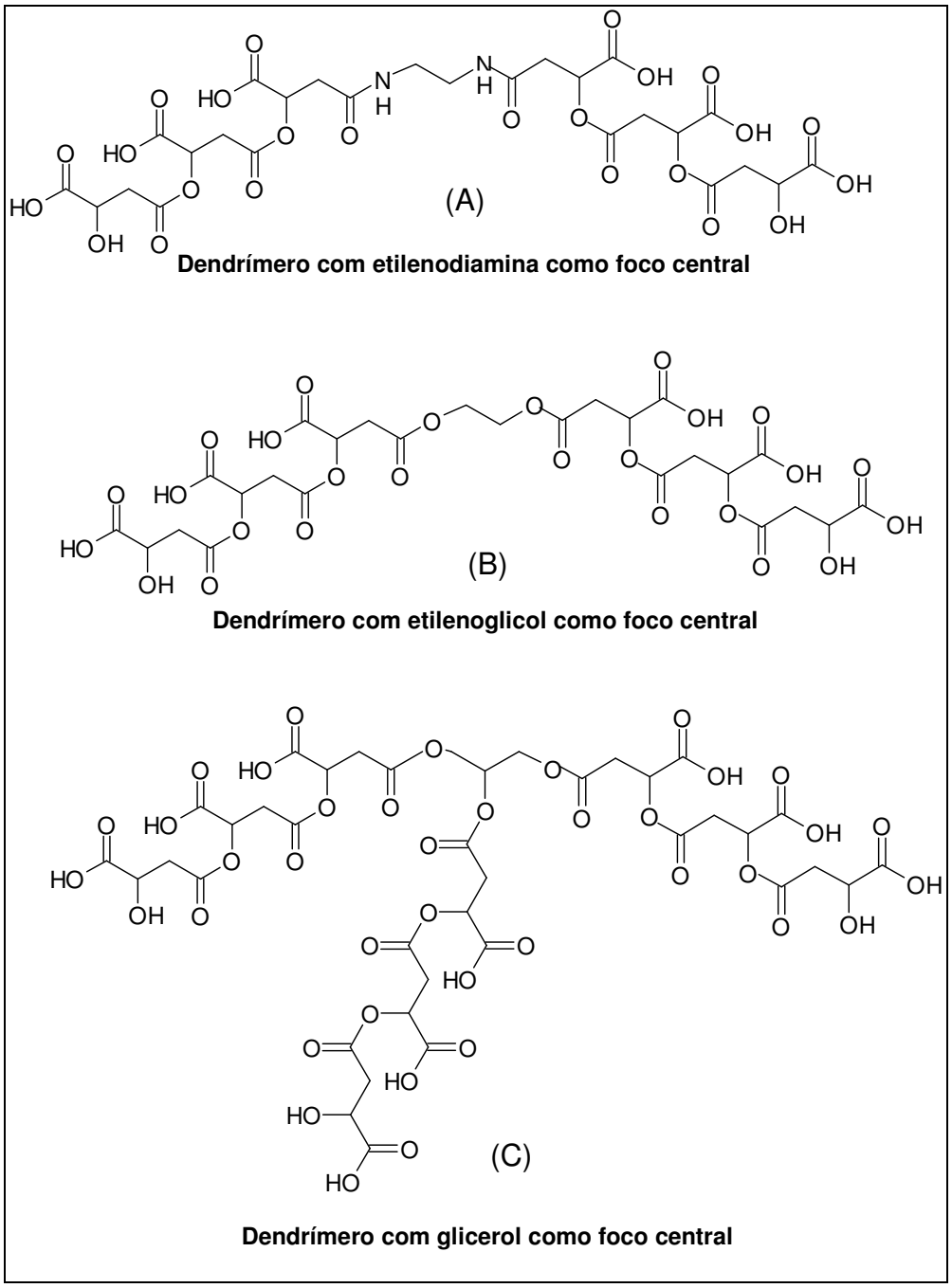


Figura A.6: Estrutura dos dendrímeros de terceira geração, sem composto bioativo, planejados com os novos focos centrais: (A) etilenodiamina, (B) etilenoglicol e (C) glicerol.

A.2.2 Síntese dos dendrímeros dirigidos de 3-hidroxiflavona pelo método convergente

Com vistas à necessidade de novas abordagens terapêuticas e fármacos para leishmaniose, levando em conta a promissora atividade leishmanicida apresentada por muitos flavonoides, que surpreendem quanto à eficácia e à seletividade

(TASDEMIR et al., 2006), e ante à utilização de dendrímeros como transportadores (FERREIRA, GIAROLLA, 2008), abordagem do projeto de Dissertação, objetivou-se a síntese de fármaco dirigido dendrimérico de 3-hidroxiflavona. A estrutura proposta para o fármaco dirigido com manose é a que se observa à Figura A.7. A Figura A.8 mostra a estrutura proposta para o fármaco dirigido com inositol como grupo diretor. Nessas sínteses, manteve-se o foco central inositol.

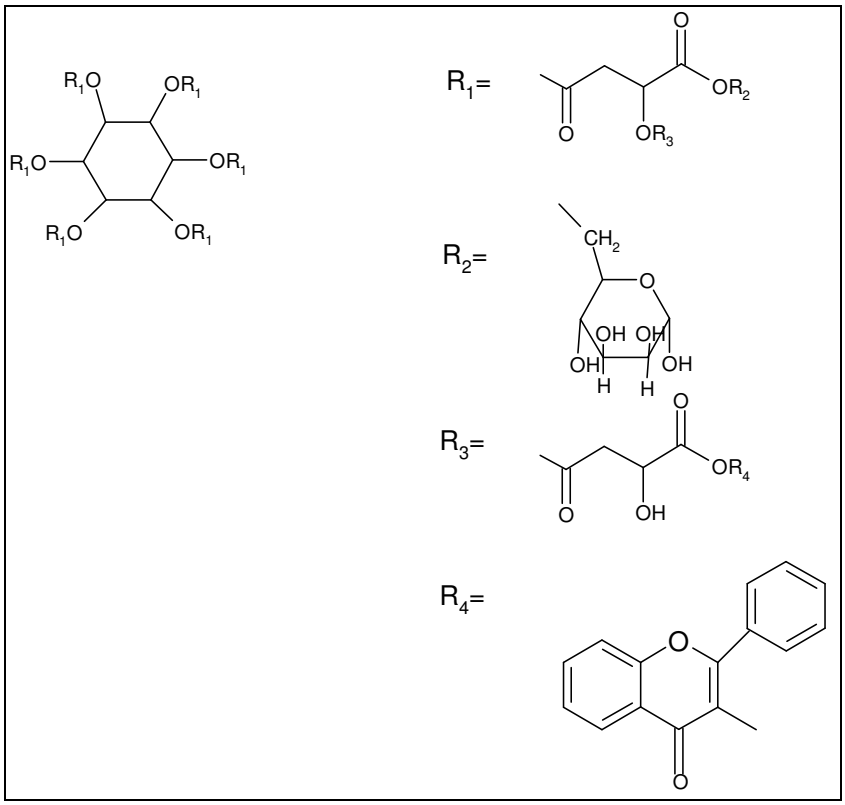


Figura A.7: Estrutura final proposta para o dendrímero dirigido de 3-hidroxiflavona com manose.

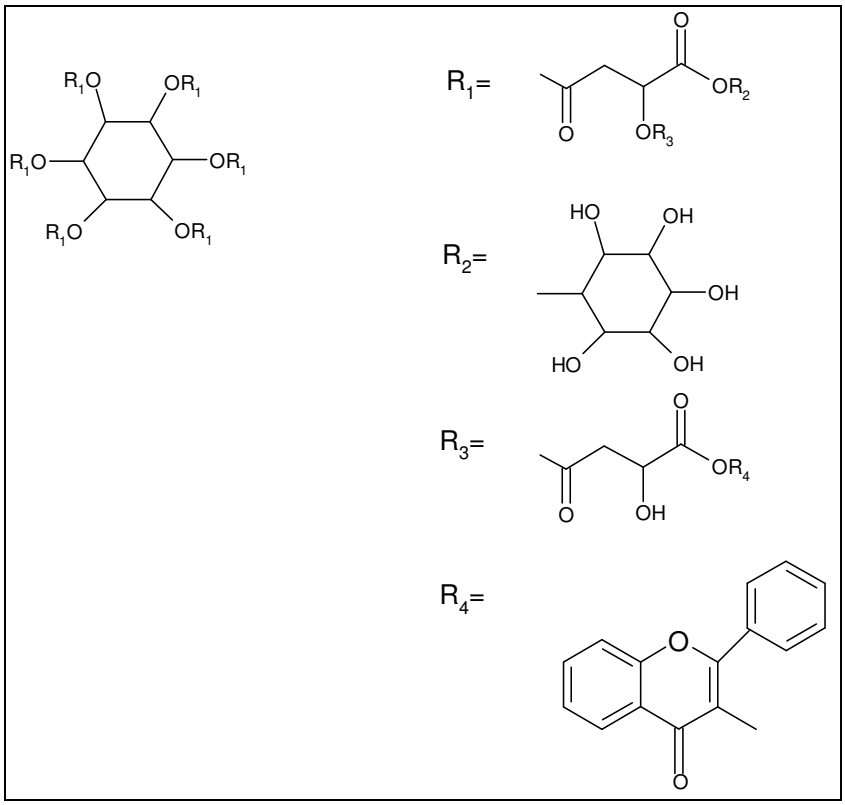


Figura A.8: Estrutura final proposta para o dendrímero dirigido de 3-hidroxiflavona com inositol.

A.2.3 Modelagem molecular para predição da liberação de dendrímeros dirigidos de quercetina

Considerando-se a necessidade de descoberta e desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas, a quercetina apresentou promissora atividade leishmanicida com menor toxicidade que os agentes atualmente disponíveis na terapêutica. Foram realizados estudos de modelagem molecular para obter informações sobre a liberação de dendrímeros dirigidos de primeira geração de quercetina frente à ação de esterases inespecíficas. Construíram-se modelos de dendrímeros dirigidos de quercetina com ação seletiva no macrófago, devido à presença de manose em sua estrutura (Figura A.9), e dendrímeros dirigidos de quercetina de ação seletiva no parasita, devido à presença de inositol na estrutura (Figura A.10).

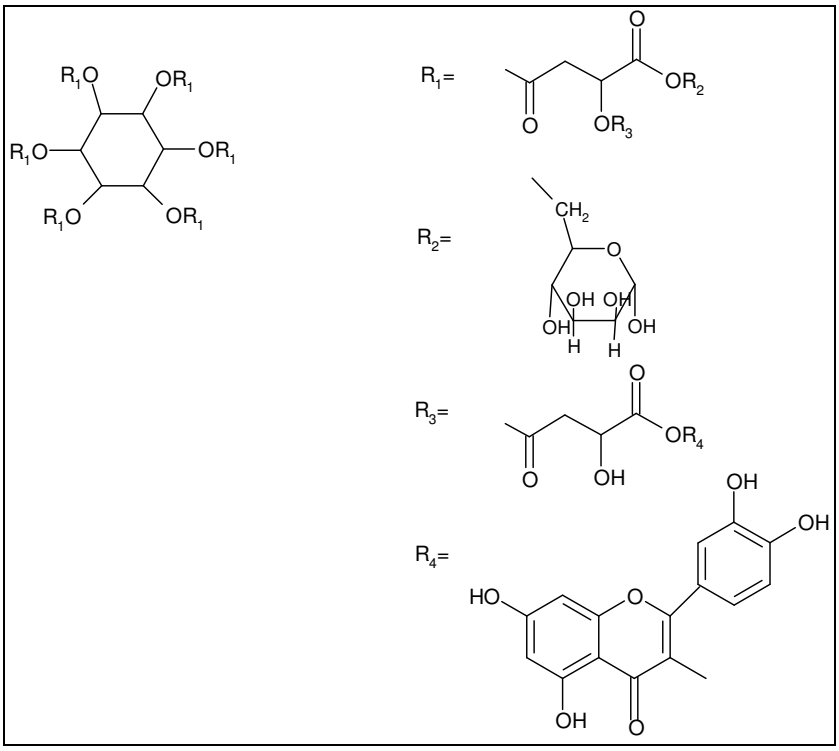


Figura A.9: Estrutura final proposta para o dendrímero dirigido de quercetina com manose.

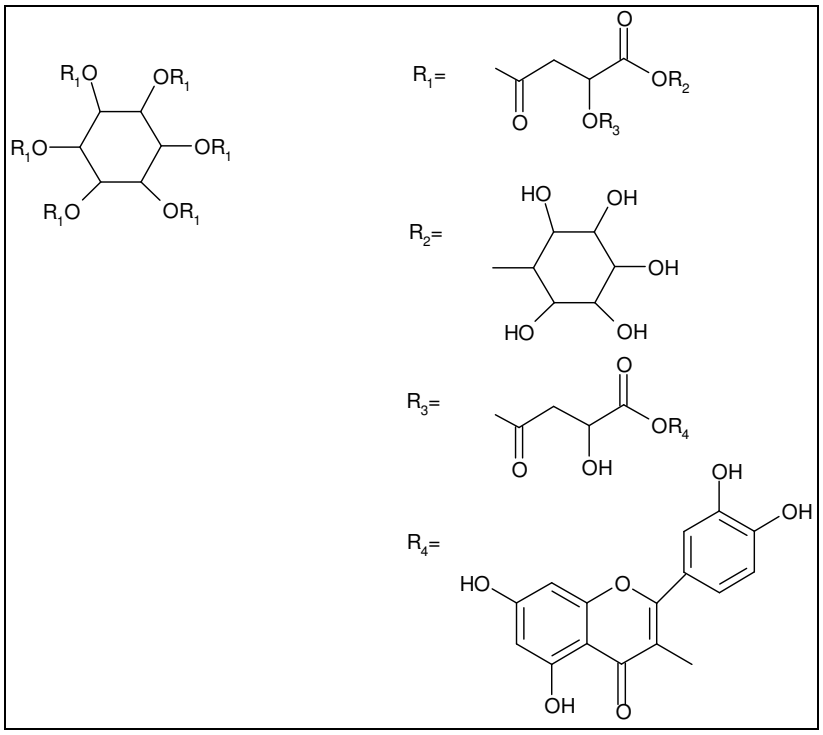


Figura A.10: Estrutura final proposta para o dendrímero dirigido de quercetina com inositol.

A.3 MATERIAL E MÉTODOS

A.3.1 Material

A.3.1.1 *Reagentes*

- 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC);
- 3-hidroxiflavona;
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP);
- 4-nitrofenilcloroformato;
- acetato de etila;
- acetonitrila;
- ácido acético glacial;
- ácido clorídrico;
- ácido L(-)-málico protegido;
- ácido *p*-toluenossulfônico;
- bicarbonato de sódio;
- cloreto de sódio;
- cloroformato de etila;
- clorofórmio;
- clorofórmio deuterado;
- dicicloexilcarbodiimida (DCC);
- diclorometano;
- etilenodiamina;
- etilenoglicol;
- glicerol;
- hexano;
- hidróxido de sódio;
- metanol;
- *N*-metilmorfolina;
- quercetina;
- sulfato de sódio anidro;
- tetraidrofurano (THF).

A.3.1.2 *Equipamentos*

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

A.3.1.3 *Softwares para modelagem molecular*

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

A.3.2. Métodos

A.3.2.1 *Síntese*

Este trabalho foi realizado em colaboração com a Dra. Jeanine Giarolla, o Dr. Fabrício Vargas e a mestranda Andressa Polidoro.

A.3.2.1.1 *Síntese dos dendrímeros com diferentes focos centrais pelo método divergente*

A.3.2.1.1.1 Síntese dos intermediários I com diferentes núcleos

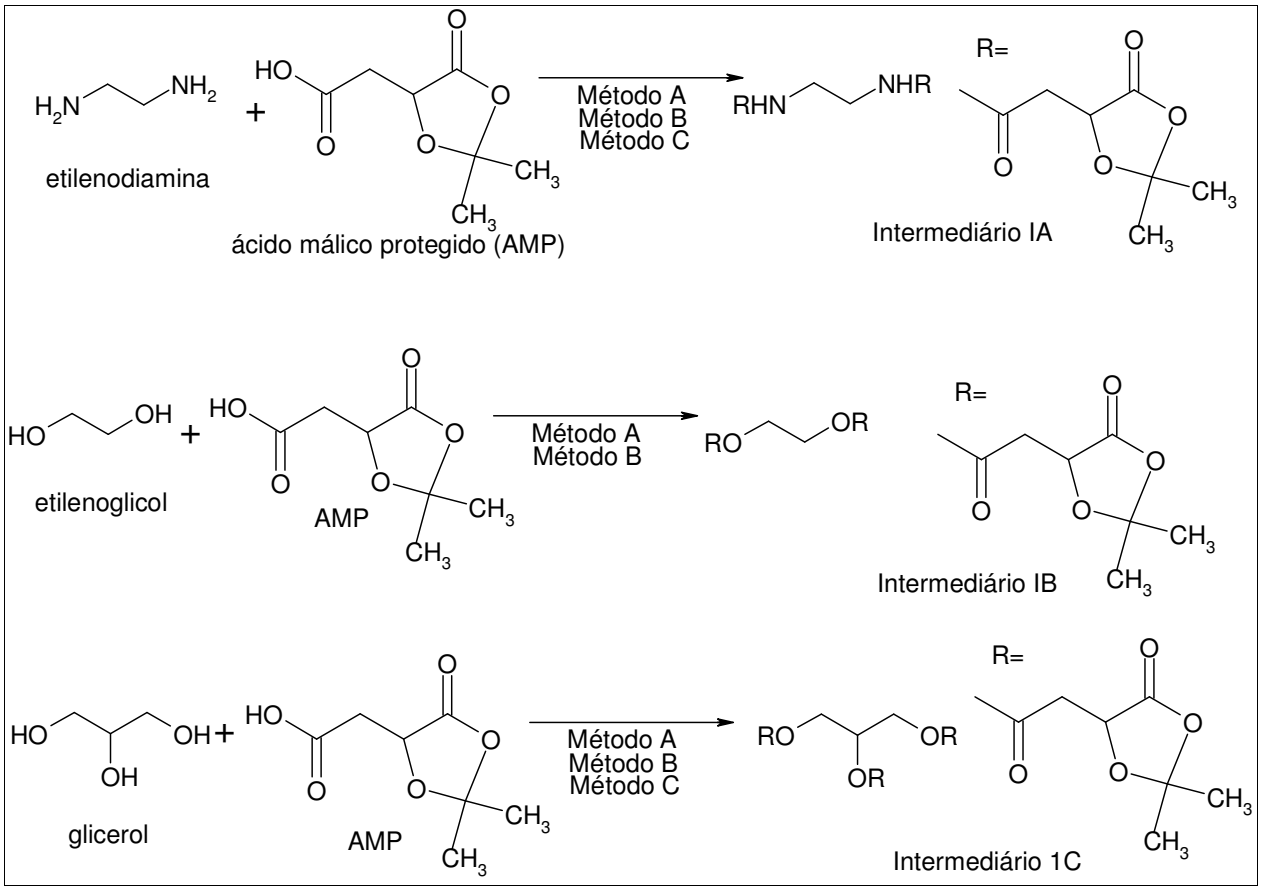


Figura A.11: Reação de acoplamento (amidação ou esterificação) com o ácido málico protegido, obtenção dos intermediários IA, IB e IC, com diferentes focos centrais.

❖ Método A - 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) como agente condensante (adaptado de GOLDBERG, GHANDEHARI, SWAAN, 2010; GIAROLLA, 2007) (Figura A.11).

Em balão acoplado a condensador de refluxo e banho de gelo, mantiveram-se sob agitação em 30 mL de THF, ácido málico protegido e agente condensante EDC (Tabela A.I). Após 30 minutos, o banho de gelo foi retirado, elevou-se a temperatura a 50 ºC e adicionaram-se DMAP e o foco central (etilenodiamina, etilenoglicol ou glicerol) (Tabela A.I). Manteve-se o meio reacional sob agitação por 24 horas. Posteriormente, ao meio reacional, adicionaram-se 50 mL de acetato de etila e o material foi extraído em sistema água e acetato de etila. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 50 ºC, obtendo-se o respectivo intermediário I.

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

Tabela A.I – Reagentes e concentrações utilizadas para os experimentos A1, A2 e A3

Experimento	Reagentes	mmol
A1	- AMP	5,75
	- EDC	6,27
	- etilenodiamina	2,85
	- DMAP	2,85
A2	- AMP	5,75
	- EDC	6,27
	- etilenoglicol	2,85
	- DMAP	2,85
A3	- AMP	5,75
	- EDC	6,27
	- glicerol	1,90
	- DMAP	1,90

- Método B – método do anidrido misto (adaptado de VARGAS, 2007) (Figura A.11)

Em banho de gelo, adicionou-se a solução de *N*-metilmorfolina em 3 mL de THF à solução de ácido málico protegido dissolvido em 3 mL de THF. Agitou-se por 15 minutos, adicionando-se, então, o respectivo cloroformato solubilizado em 3 mL de THF (Tabela A.II). Manteve-se a agitação por mais 30 minutos e adicionou-se a solução o foco central (etilenodiamina, etilenoglicol ou glicerol) em 3 mL de THF (Tabela A.II). A reação foi mantida sob agitação e banho de gelo por mais 1 hora. Posteriormente, o meio reacional foi mantido sob agitação conforme as condições relatadas na Tabela A.II. Ao término da reação, diluiu-se a mistura reacional com 50 mL de solvente adequado (Tabela A.II) 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 com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida a 50 ºC, obtendo-se o respectivo intermediário I.

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

Tabela A.II – Reagentes, concentrações, condições reacionais e solventes para extração utilizados para os experimentos B1, B2, B3, B4, B5, B6 e B7

Experimento	Reagentes	mmol	Condições reacionais	Solvente para extração
B1	- AMP	5,75	Tempo: 24 h	acetato de
	- cloroformato de etila	12,50	T.A.*	etila
	- etilenodiamina	2,85		
	- *N*-metilmorfolina	12,50		
B2	- AMP	5,75	Tempo: 24 h	acetato de
	- cloroformato de etila	12,50	T.A.*	etila
	- etilenoglicol	2,85		
	- *N*-metilmorfolina	12,50		

*T.A.: Temperatura ambiente

Tabela A.II – Reagentes, concentrações, condições reacionais e solventes para extração utilizados para os experimentos B1, B,2, B3, B4, B5, B6 e B7 (cont.)

Experimento	Reagentes	mmol	Condições reacionais	Solvente para extração
B3	- AMP	5,75	Tempo: 24 h	acetato de etila
	- cloroformato de etila	18,00	T.A.*	
	- glicerol	1,90		
	- *N*-metilmorfolina	18,00		
B4	- AMP	1,00	Tempo: 24 h	diclorometano
	- 4-nitrofenilcloroformato	1,00	T.A.*	
	- etilenodiamina	0,50		
	-*N*-metilmorfolina	1,00		
B5	- AMP	5,75	Tempo: 48 h	diclorometano
	- cloroformato de etila	12,50	55º C	
	- etilenodiamina	2,85		
	-*N*-metilmorfolina	12,50		
B6	- AMP	1,00	Tempo: 24 h	diclorometano
	- 4-nitrofenilcloroformato	1,25	T.A.*	
	- etilenoglicol	0,10		
	- *N*-metilmorfolina	1,00		
B7	- AMP	1,00	Tempo: 24 h	diclorometano
	- 4-nitrofenilcloroformato	1,07	T.A.*	
	- glicerol	0,33		
	- *N*-metilmorfolina	1,07		

*T.A.: Temperatura ambiente

- Método C – dicicloexilcarbodiimida (DCC) como agente condensante (Figura A.11)

Em banho de gelo, mantiveram-se sob agitação ácido málico protegido e DCC, em 30 mL de THF (Tabela A.III). Após 30 minutos, o banho de gelo foi retirado e adicionaram-se DMAP e o foco central (Tabela A.III). A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente conforme as condições reacionais descritas na Tabela A.III. Após este período, adicionou-se o solvente adequado e filtrou-se o conteúdo reacional (Tabela A.III). O filtrado foi extraído como relatado na Tabela A.III. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O solvente foi removido sob pressão reduzida, a 50 ºC.

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

Tabela A.III – Condições reacionais e tratamento realizados nos experimentos C1 e C2

Experimento	Reagentes/ solvente	mmol/ volume (mL)	Condições reacionais (horas)	Tratamento da reação
C1	- AMP - DCC - etilenodiamina - DMAP	5,75 7,11 0,96 3,84	96	Éter etílico 30 mL Filtração
C2	- AMP - DCC - glicerol - DMAP	17,20 6,32 5,74 6,32	24	acetato de etila 120 mL Condições de extração: $NAHCO_3$* - 100 mL – 1 vez NaCl* – 100 mL – 1 vez Água – 100 mL – 1 vez

A.3.2.1.2 *Síntese do dendrímero dirigido de 3-hidroxiflavona pelo método convergente (inositol como foco central)*

A.3.2.1.2.1 Síntese do intermediário II (adaptado de VARGAS, 2007).

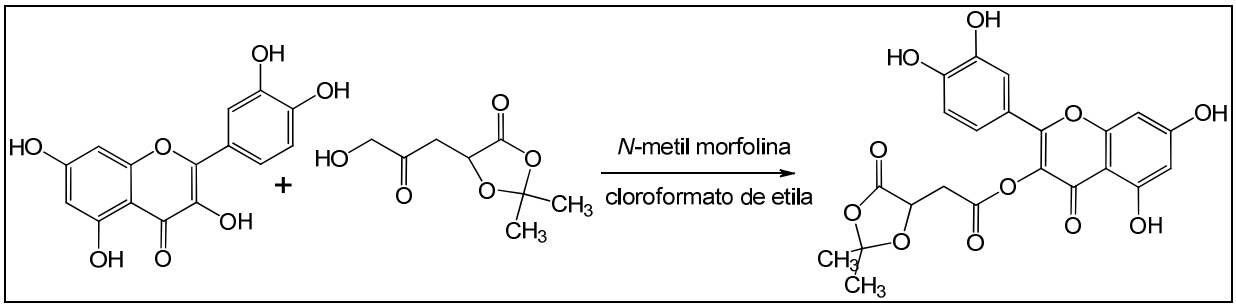


Figura A.12: Síntese do intermediário II.

Em banho de gelo, mantiveram-se sob agitação em 30 mL de THF, *N*-metilmorfolina (8,44 mmol) e ácido málico protegido (8,44 mmol) por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se cloroformato de etila (10,10 mmol). Manteve-se a agitação por mais 30 minutos e adicionou-se a quercetina (8,44 mmol). A reação foi mantida sob agitação e banho de gelo por mais 1 hora. Após este período, o meio reacional foi mantido sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Ao término da reação, diluiu-se a mistura reacional com 50 mL de acetato de etila e lavou-se, subsequentemente, com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M (duas vezes com 15 mL), solução saturada de cloreto de sódio (15 mL), solução 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 o solvente removido sob pressão reduzida a 50 ºC, obtendo-se o intermediário II (Figura A.12).

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

A.3.2.1.2.2 Síntese do intermediário III (adaptado de VARGAS, 2007).

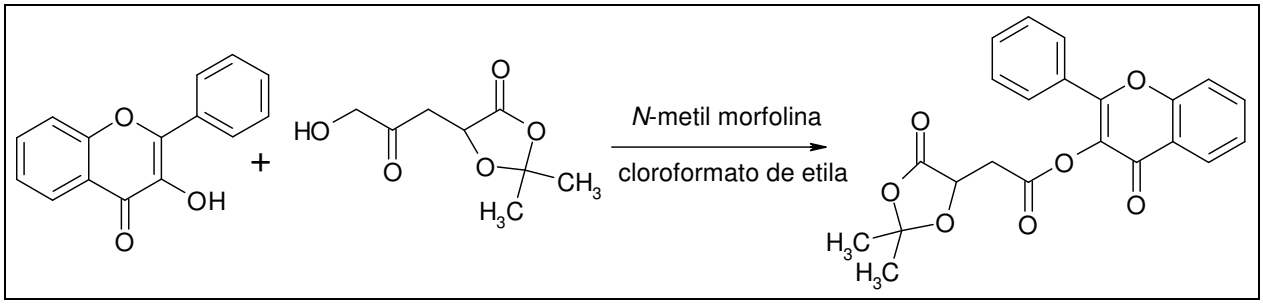


Figura A.13: Síntese do intermediário III.

Em banho de gelo, mantiveram-se sob agitação em 30 mL de THF, *N*-metilmorfolina (6,80 mmol) e ácido málico protegido (5,75 mmol) por 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se cloroformato de etila (6,80 mmol). Manteve-se a agitação por mais 30 minutos e adicionou-se a 3-hidroxiflavona (5,75 mmol). A reação foi mantida sob agitação e banho de gelo por mais 1 hora. Após este período, o meio reacional foi mantido sob agitação em temperatura ambiente por 24 horas. Ao término da reação, diluiu-se a mistura reacional com 50 mL de acetato de etila e lavou-se, subsequentemente, com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M (duas vezes com 15 mL), solução saturada de cloreto de sódio (15 mL), solução 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 o solvente removido sob pressão reduzida a 50 ºC (Figura A.13).

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

O produto final foi purificado em coluna cromatográfica, com eluente hexano/acetato de etila em gradiente de concentração, obtendo-se o intermediário III.

A.3.2.1.2.3 Desproteção do intermediário III, obtenção do intermediário IV

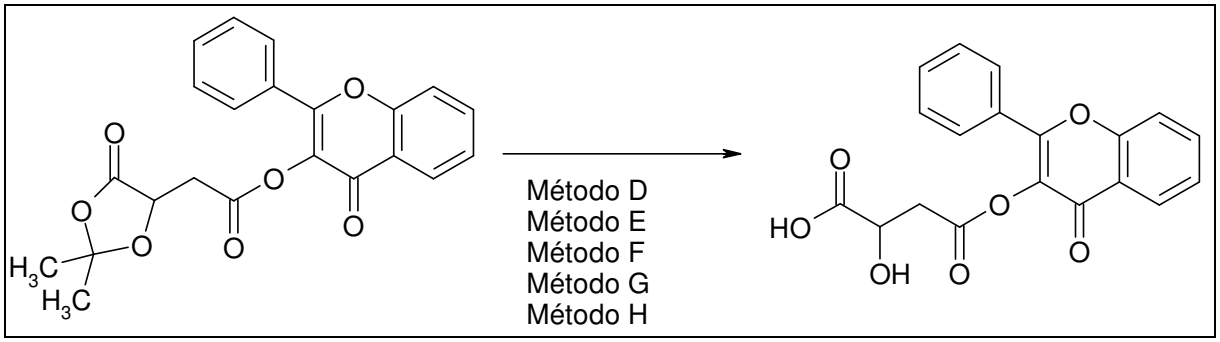


Figura A.14 Hidrólise do intermediário III, obtenção do intermediário IV.

❖ Método D (adaptado de DAMEN *et al.*, 2000).

Em sistema de refluxo, o intermediário III (0,50 mmol) foi dissolvido em 93 mL de acetato de etila. Posteriormente, adicionaram-se 18,5 mL de solução de ácido clorídrico 3,5 M. O meio reacional foi mantido sob agitação a 45 ºC por 15 minutos. O produto foi concentrado sob pressão reduzida a 50 ºC (Figura A.14).

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

❖ Método E (adaptado de MANTELL, 2007).

O intermediário III (1 mmol) foi dissolvido em 16 mL de THF e adicionou-se ácido *p*-toluenossulfônico (2,4 mmol). O conteúdo reacional ficou sob agitação à temperatura ambiente por 4 horas (Figura A.14).

O experimento foi acompanhado por cromatografia em camada delgada, com fase móvel hexano/acetato de etila 2:1 (v/v).

❖ Método F (BANVILLE *et al.*, 2010).

O intermediário III (1 mmol) foi mantido sob agitação, em 5 mL de THF e 5 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1 M, na proporção 1:1 (v/v) por 10 minutos (Figura A.14).

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

❖ Método G (adaptado de MANTELL, 2007).

O intermediário III ($2{,}54 \times 10^{-3}$ mol) foi dissolvido em ácido clorídrico 1 M e

acetonitrila 1:1 (v/v). O meio reacional foi mantido sob agitação por 22 horas. O produto foi concentrado sob pressão reduzida a 50 ºC (Figura A.14).

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

- Método H (adaptado de DAMEN *et al.*, 2000).

Dissolveu-se o intermediário III (0,50 mmol) na solução de ácido acético, THF e água, de acordo com as proporções molares descritas na Tabela A.IV. A mistura reacional foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente conforme as condições reacionais descritas na Tabela A.IV. Posteriormente, os solventes foram removidos sob pressão reduzida a 50 ºC. Após a remoção do solvente, o produto foi lavado com água, acetato de etila e diclorometano, com 5 mL de cada solvente e concentrado novamente sob pressão reduzida (Figura A.14).

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

Tabela A.IV – Concentrações de reagentes e condições reacionais utilizadas para os experimentos H1, H2, H3 e H4

Experimento	Reagentes	Proporção molar dos reagentes (v/v/v)	Tempo de reação (horas)
H1	- ácido acético	1	6
	- THF	1	
	- água destilada	1	
H2	- ácido acético	4	6
	- THF	1	
	- água destilada	2	
H3	- ácido acético	1	28
	- THF	1	
	- água destilada	1	
H4	- ácido acético	1	48
	- THF	1	
	- água destilada	1	

A.3.2.2 Métodos de análise dos compostos obtidos

A.3.2.2.1 *Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)*

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

A.3.2.2.2 *Espectrofometria no Infravermelho (IV)*

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

A.3.2.2.3 *Análise Cromatográfica em Camada Delgada (CCD)*

A análise cromatográfica em camada delgada foi realizada com cromatoplacas de sílica-gel G-60, marca Merck, com as fases móveis apropriadas e descritas anteriormente.

A.3.2.3 ***Modelagem molecular***

A.3.2.3.1 *Estudo de liberação dos dendrímeros dirigidos de quercetina* (GIAROLLA *et al.*, 2010).

As estruturas tridimensionais dos dendrímeros dirigidos de primeira geração com uma, duas e três ramificações de quercetina (agente bioativo) e grupo diretor (*mio*-inositol e manose) foram construídas usando o *software* HyperChem 7.51. As estruturas cristalografadas de *mio*-inositol (grupo diretor e foco central), *D*-manose (grupo diretor), ácido málico (agente espaçante) e quercetina foram obtidas do banco de dados de estruturas químicas *Protein Data Bank* (PDB) e utilizadas como padrões de geometria para a construção dos modelos tridimensionais com os seguintes códigos de entrada: 3HO6 (PRUIT *et al.*, 2009), 3M8M (SUNDARAMOORTHY, GOLD, POULOS, 2010), 3DR3 (SINGER *et al.*, 2009), 3BPT (PILKA *et al.*, 2009) e resolução 1,60, 1,05, 1,45, 1,50 Å, respectivamente. A minimização de energia de cada modelo (uma a três ramificações de quercetina e grupo diretor *mio*-inositol e quercetina e grupo diretor *D*-manose) foi realizada por mecânica molecular com campo de força Mecânica Molecular (MM+) com a utilização dos *softwares* HyperChem 7,51 e MOLSIM 3,2. As cargas atômicas

parciais foram calculadas utilizando o método semiempírico AM1, também implementado no programa HyperChem 7,51.

Os modelos obtidos com menor energia foram utilizados como estrutura inicial para a realização das simulações de dinâmica molecular (DM), efetuadas a 100.000 passos, cada passo de 1 fs a 300 K. Os arquivos de trajetória foram gerados a cada 20 passos, resultando em 5.000 conformações para cada modelo. A conformação de menor energia de cada modelo foi selecionada a partir de simulações de DM e as cargas de potencial eletrostático (ChelpG – *Potential Electrostatic Charges*) foram calculadas usando o método *ab initio* HF/6-31G* com a utilização do *software* Gaussian G03W. O potencial eletrostático (PE) foi mapeado em superfície *Connolly* para cada modelo. A escala utilizada no mapa de potencial eletrostático variou de -7,5 a 7,5 eV^{-2} e os valores negativos de potencial eletrostático (alta densidade eletrônica) são representados em vermelho, enquanto os valores positivos estão em azul (baixa densidade eletrônica).

O *software* ViewerLite 4.2 foi utilizado para: determinação das ligações de hidrogênio e visualização do modelo CPK para a análise de impedimento estérico dos dendrímeros dirigidos construídos.

A.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A.4.1 Síntese

A.4.1.1 *Síntese dos dendrímeros com diferentes focos centrais pelo método divergente*

Para o planejamento de novos dendrímeros utilizaram-se diferentes substâncias para modificação do foco central como: etilenodiamina, etilenoglicol e glicerol. Estes compostos são polifuncionais, o que permite o crescimento exponencial dos dendrímeros, mas por apresentarem menor número de grupos funcionais (dois para etilenodiamina e etilenoglicol, e três hidroxilas para o glicerol), quando comparados ao *mio*-inositol (seis hidroxilas), possibilitam maior controle das reações e do número de substituições dos compostos obtidos a partir destes focos centrais.

A.4.1.1.1*Síntese dos intermediários I com diferentes núcleos (Figura A.11)*

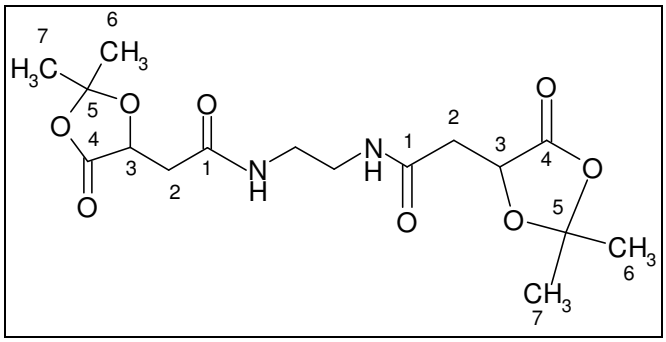
❖ <u>Método A - EDC como agente condensante</u>

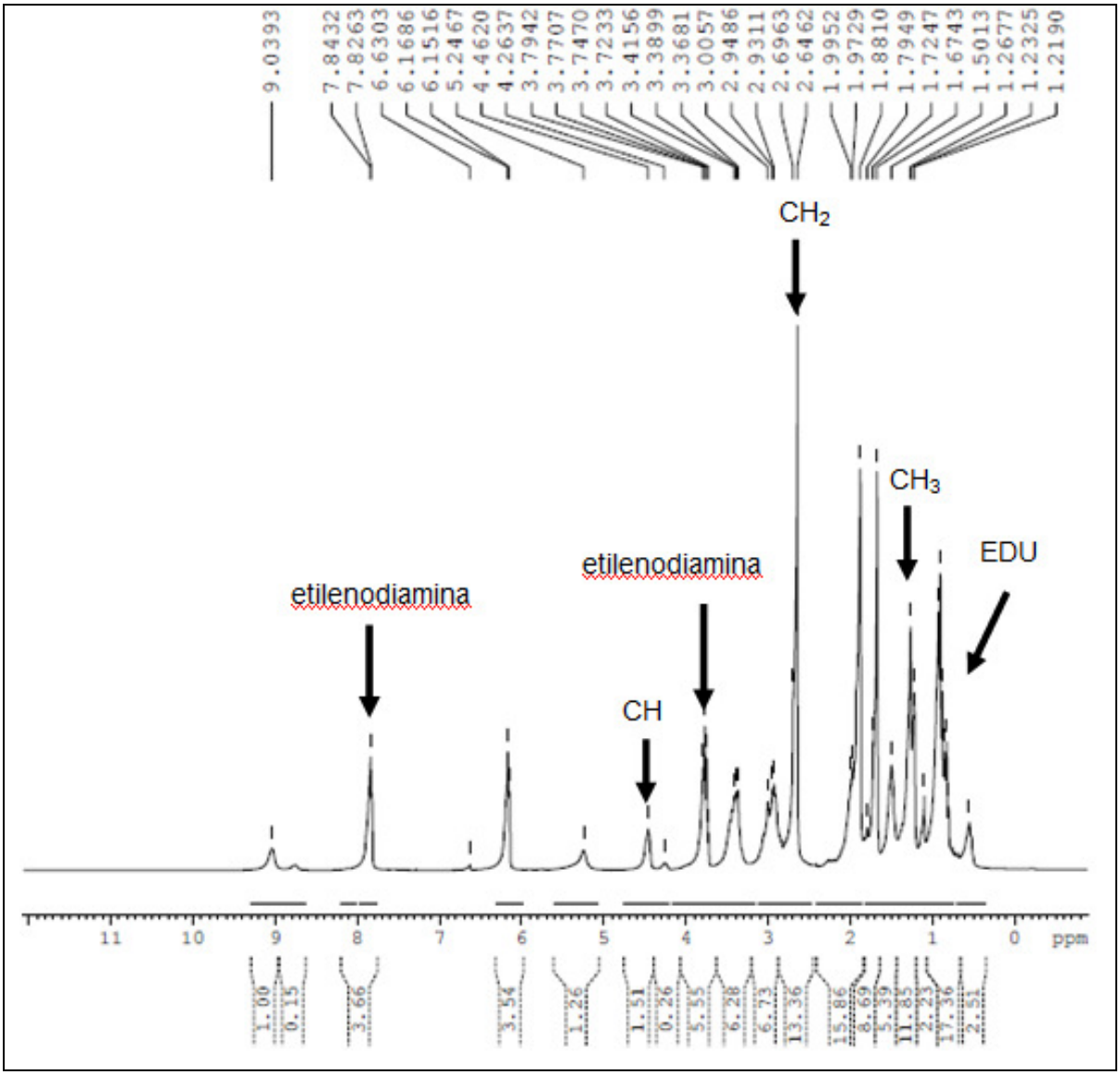
⇒ Etilenodiamina

Para a síntese do intermediário IA (Figura A.11) utilizou-se a quantidade de etilenodiamina e ácido málico protegido na proporção molar de 1:2. Após 24 horas de reação, a cromatografia em camada delgada mostrou mancha com R*f* 0,80, diferente dos valores encontrados para os materiais de partida, etilenodiamina e ácido málico protegido, que apresentam os valores R*f* de 0,12 e 0,23, respectivamente. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.1) mostra indícios da obtenção do produto desejado, pois existem sinais correspondentes aos hidrogênios das metilas presentes no ácido málico protegido em 1,67 e 1,72 ppm. Além disso, existem sinais em 2,90 e 4,46 ppm, que caracterizam o agente espaçante. Os sinais em 3,41 e 7,84 ppm sugerem, respectivamente, a presença dos hidrogênios dos carbonos e do nitrogênio da etilenodiamina.

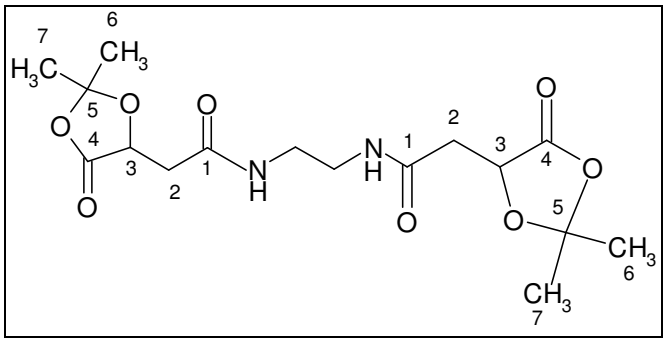
O espectro de RMN ^{13}C (Espectro A.2) mostrou sinais em 25,24 e 25,49, 26,25 e 26,71 ppm, relativos aos carbonos das metilas presentes na lactona do

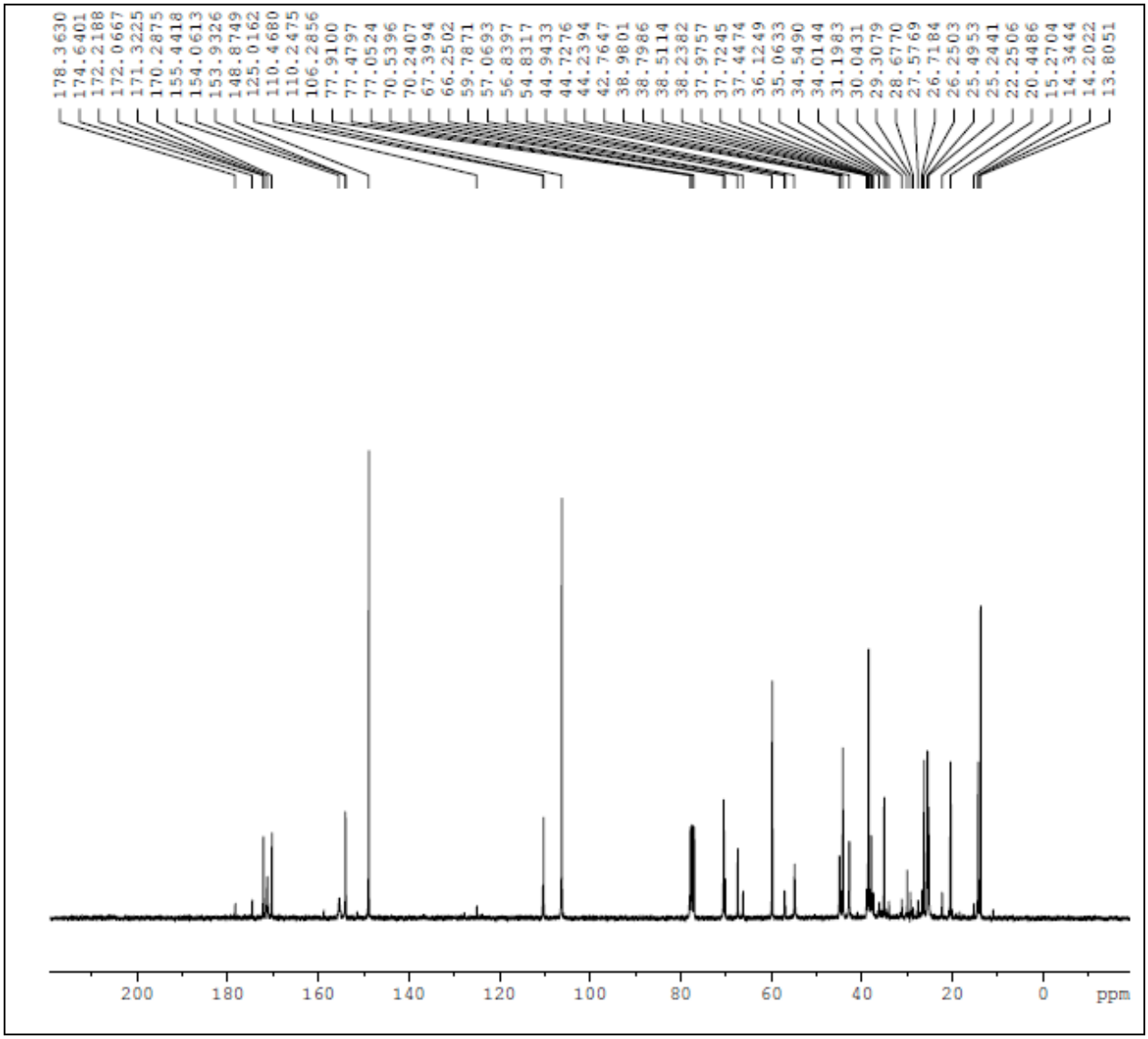
ácido málico protegido. Ainda com relação ao agente espaçante, observam-se sinais em 35,06 e 36,12, 70,24 e 70,53, 110,24 e 110,46 ppm referentes aos carbonos 5, 2 e 3 do ácido málico protegido, respectivamente. Os sinais entre 170,28 e 172,21 ppm são indicativos de carbonos carbonílicos do ácido málico protegido e da função amida formada. Com relação à etilenodiamina, apareceram sinais em 44 ppm, provavelmente relativos aos carbonos metilênicos da etilenodiamina. Estes resultados indicam a provável obtenção do intermediário I com duas substituições. No entanto, há sinais adicionais, que mostram impurezas, provavelmente, EDU, no composto obtido, evidenciando a necessidade de purificação do mesmo.





Espectro A.1: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre etilenodiamina e ácido málico protegido, obtido com o uso de EDC como agente condensante.



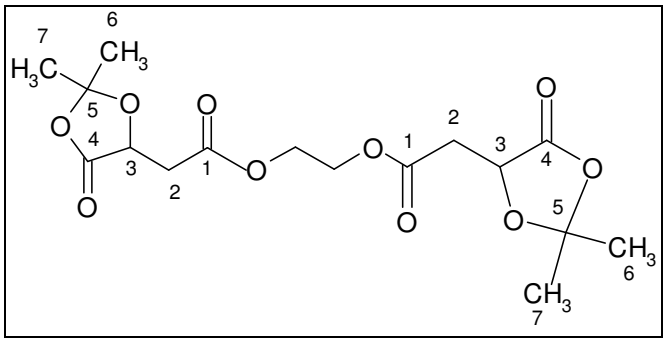


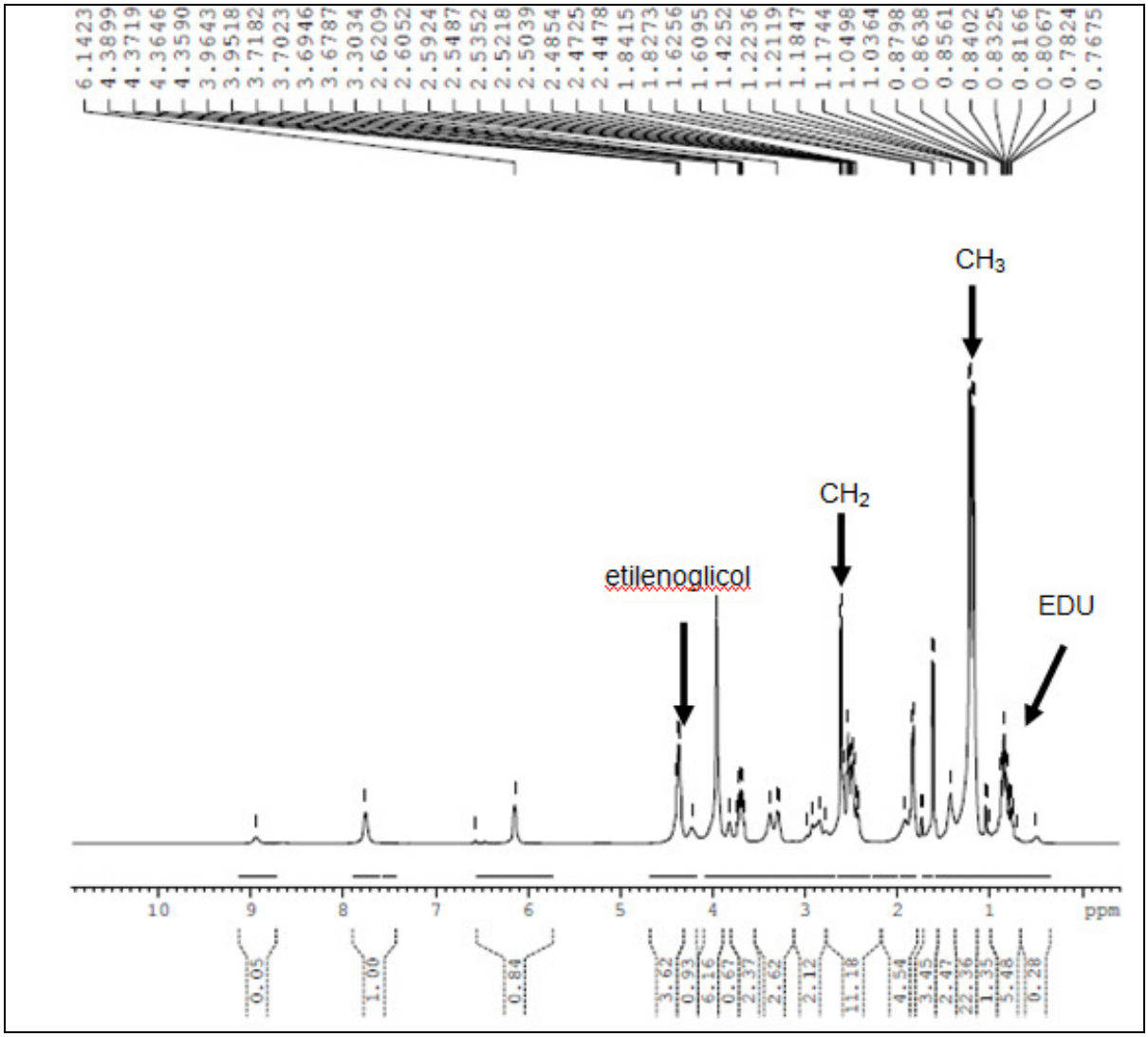
Espectro A.2: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre etilenodiamina e ácido málico protegido, obtido com o uso de EDC como agente condensante.

⇒ Etilenoglicol

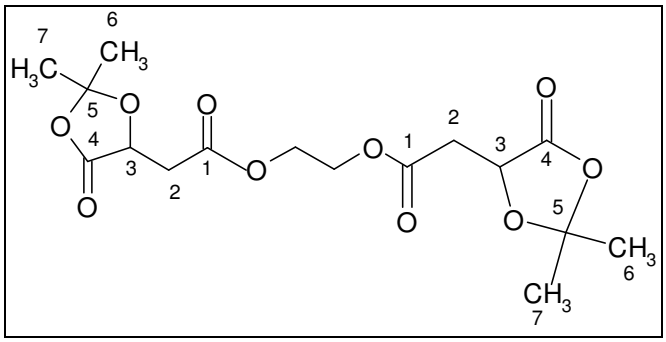
O intermediário IB (Figura A.11) é formado pela reação de esterificação entre o álcool e o ácido carboxílico de etilenoglicol e ácido málico protegido, respectivamente. Para a esterificação entre o etilenoglicol e o ácido málico protegido foi utilizada a proporção molar de 1:2, para que ocorram as duas substituições possíveis. Na cromatografia em camada delgada, observou-se mancha com R*f* de 0,69, valor diferente dos materiais de partida, etilenoglicol e ácido málico protegido, de R*f* 0,15 e 0,23, respectivamente. No espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.3) aparecem sinais em 1,60 e 1,62 ppm, indicativos de hidrogênios dos carbonos 6 e 7 do ácido málico protegido. Em adição, observam-se os sinais próximos a 2,50 e 2,60 ppm, relativos aos hidrogênios do C_2 do ácido málico protegido. Os sinais próximos de 4,30 ppm indicam hidrogênios do etilenoglicol.

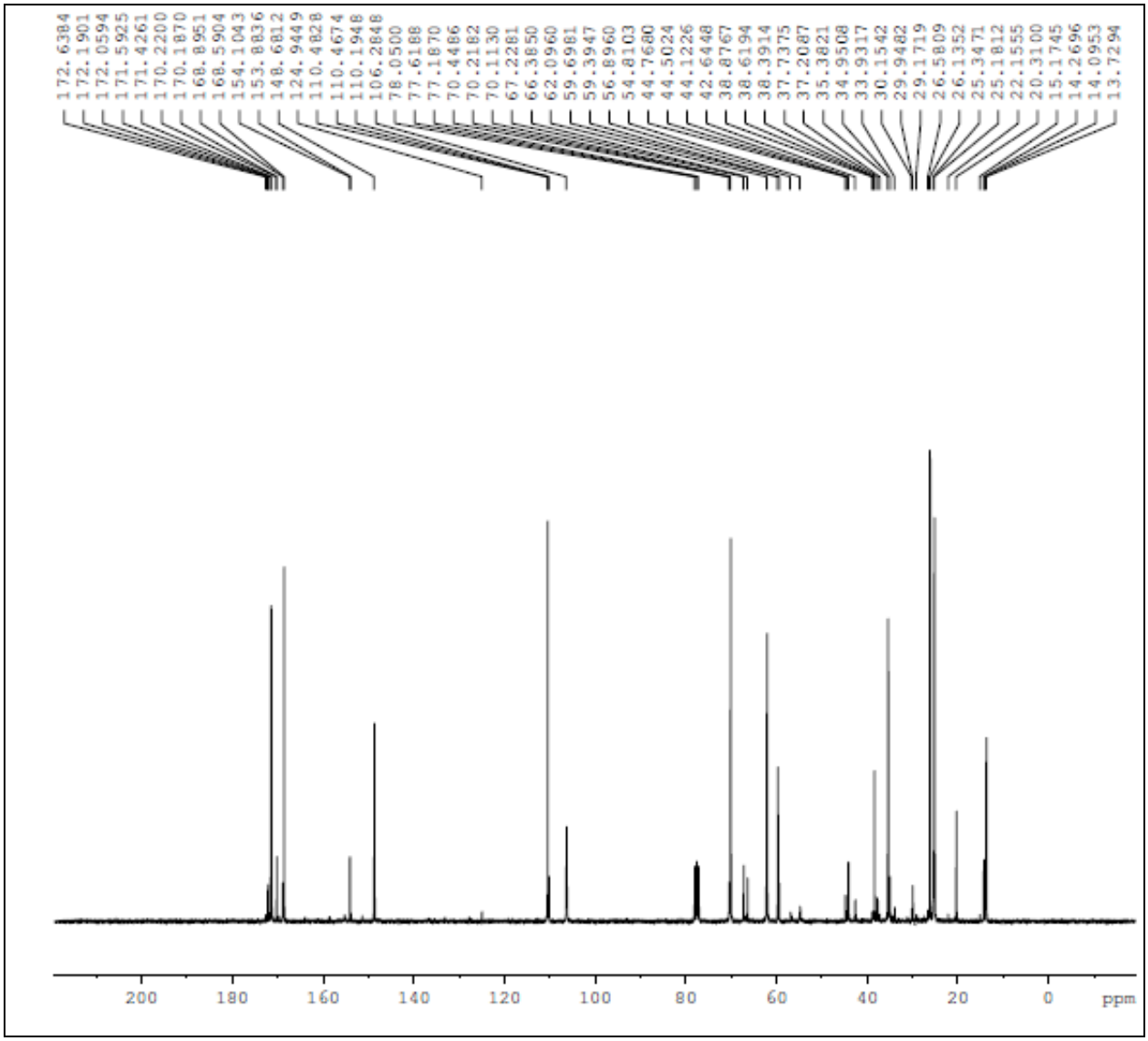
O espectro de RMN ^{13}C (Espectro A.4) mostrou sinais em 25,18 e 25,34, 26,13 e 26,58 ppm, que caracterizam carbonos metílicos do ácido. Os sinais próximos de 35, 70 e 110 ppm podem ser referentes aos carbonos 5, 2 e 3 do ácido málico protegido, respectivamente. Em adição, os sinais na região entre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





Espectro A.3: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre etilenoglicol e ácido málico protegido, obtido com o uso de EDC como agente condensante.



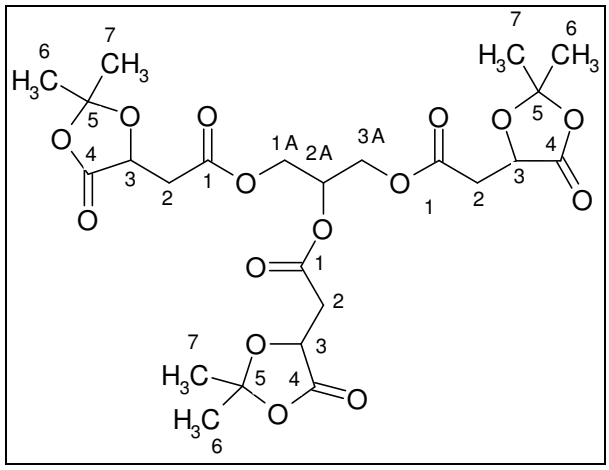


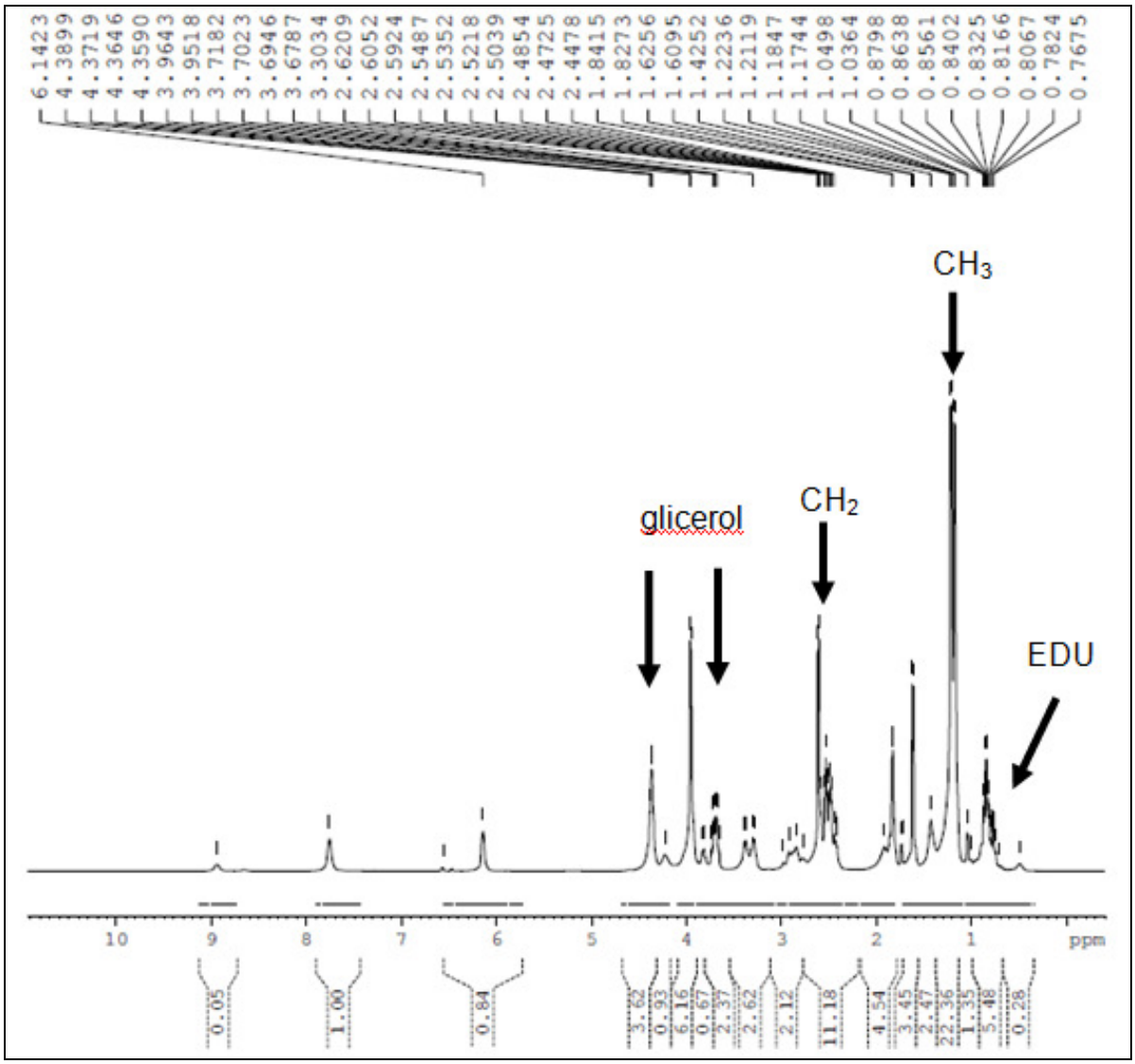
Espectro A.4: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre etilenoglicol e ácido málico protegido, obtido com o uso de EDC como agente condensante.

⇒ Glicerol

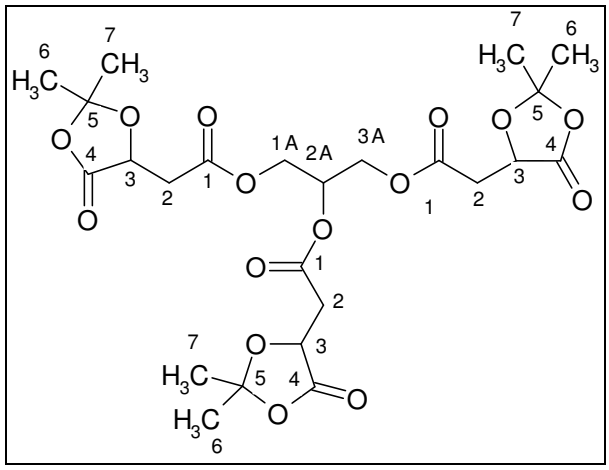
O intermediário IC (Figura A.11) é obtido pela esterificação entre o álcool e o ácido carboxílico de glicerol e ácido málico protegido, respectivamente. A proporção utilizada para a reação de esterificação entre o glicerol e o ácido málico protegido foi de 1:3, para que ocorram as três substituições possíveis. Ao término da reação, a cromatografia em camada delgada mostrou a formação de mancha com valor de R*f* igual a 0,46, diferente dos materiais de partida, glicerol e ácido málico protegido de R*f* 0,11 e 0,23, respectivamente. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.5) mostrou a presença de sinais em 1,60 e 1,62 ppm, correspondentes a hidrogênios das metilas da lactona do ácido málico protegido. Neste espectro, observam-se, também, sinais próximos de 2,60 ppm, que caracterizam o ácido málico protegido. Além disso, apareceram sinais do glicerol próximos de 4,30 ppm referentes a H_{1A} e H_{3A} e em 3,60 ppm indicativo do H_{2A}.

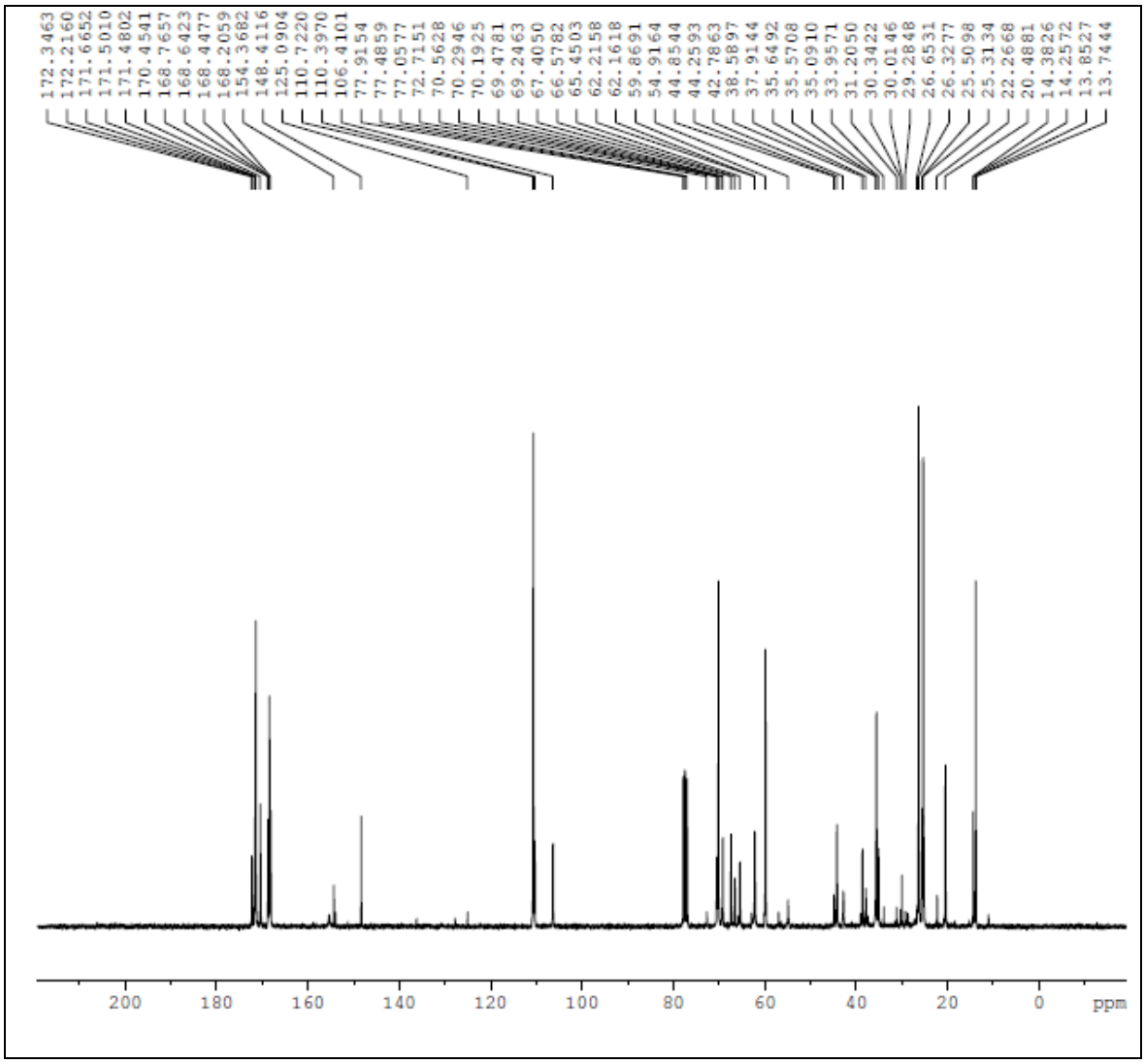
No espectro de RMN ^{13}C (Espectro A.6) observam-se sinais em 25,31 e 25,50, 26,32 e 26,65 ppm que caracterizam os carbonos das metilas do ácido málico protegido. Ainda em relação ao espaçante, os sinais próximos de 35, 70 e 110 ppm podem ser referentes aos carbonos 5, 2 e 3 do ácido málico protegido,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





Espectro A.5: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre glicerol e ácido málico protegido, obtido com o uso de EDC como agente condensante.





Espectro A.6: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre glicerol e ácido málico protegido, obtido com o uso de EDC como agente condensante.

Em adição, o excesso de sinais no espectro prejudica sua interpretação e estes podem estar relacionados com a presença do subproduto formado pelo uso de EDC nas reações de amidação e esterificação, o EDU (1-(3-diaminopropiluréia), que apresenta difícil purificação.

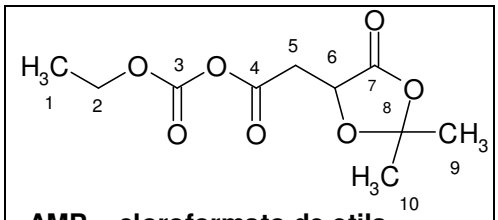
❖ Método B – método do anidrido misto

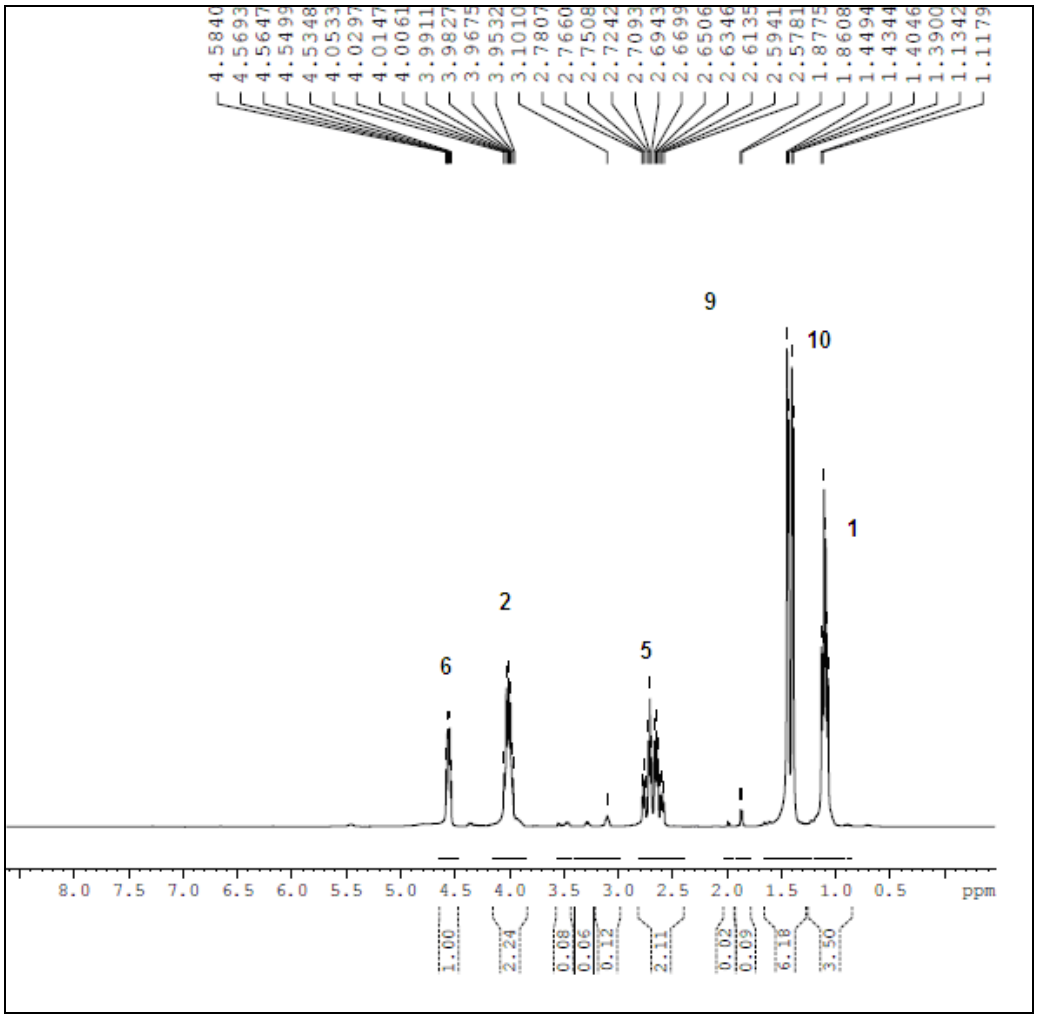
Na busca por métodos que resultem em produto mais puro, utilizou-se a síntese com *N*-metilmorfolina (como catalisador) e cloroformato de etila, como agente condensante. Efetuaram-se os experimentos B1, B2 e B3, que utilizaram etilenodiamina, etilenoglicol e glicerol, respectivamente, para reagir com ácido málico protegido, nas devidas proporções para obter o maior número de substituições possíveis dos respectivos produtos (amida e ésteres).

As placas cromatográficas dos produtos obtidos com os experimentos B1, B2 e B3 mostraram a formação de mancha com R*f* igual a 0,66, valor diferente dos materiais de partida, que apresentam R*f* 0,12, 0,15, 0,11 e 0,23, correspondentes a etilenodiamina, etilenoglicol, glicerol e ácido málico protegido, respectivamente. O espectro RMN ^{1}H do experimento B1 (Espectro A.7) mostrou sinais da presença de ácido málico protegido, deslocados para campo mais baixo, como os singletos em 1,86 e 1,87 ppm, relativos aos hidrogênios metílicos, sinais entre 2,58 e 2,76 ppm e próximos de 4,50 ppm, relacionados aos hidrogênios H_2 e H_3, respectivamente, do ácido málico protegido, porém não se identificaram os sinais de etilenodiamina. Não se obteve, portanto, o produto desejado.

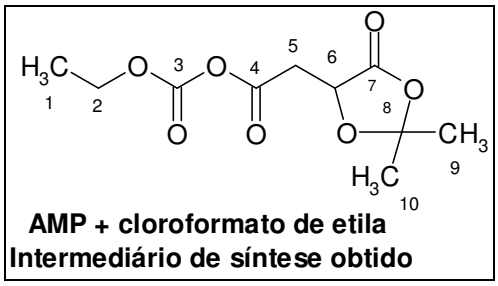
Nesta reação, há a formação de um intermediário sintético, o anidrido misto, que teve comportamento estável e não sofreu ataque nucleofílico da etilenodiamina. Portanto, a substituição não ocorreu e o que se observa no espectro é a presença deste intermediário de síntese. Os sinais em 1,13 e 1,44 ppm e próximos a 4,00 ppm estão relacionados aos hidrogênios de grupos CH_3 e CH_2 (ligados ao oxigênio da função anidrido), presentes neste intermediário. Em adição, o espectro de RMN ^{13}C (Espectro A.8) mostrou a presença deste intermediário sintético, devido aos sinais em 14,06, 61,21 e 169,13 ppm relativos aos carbonos do grupo etoxila e da carbonila do anidrido misto, respectivamente. Além disso, também estão presentes os sinais referentes ao ácido málico protegido em torno de 25-26, 35, 70, 110, 164-170 ppm, referentes, respectivamente, aos carbonos das metilas da lactona (C_6 e C_7), C_5, C_2, C_3, C_1 e C_4 desse derivado.

Realizaram-se, também, os experimentos B2 e B3, para obtenção dos respectivos ésteres, com etilenoglicol e glicerol. Com estes experimentos, obtiveram-se resultados análogos aos observados com o experimento B1, ou seja, a formação do intermediário sintético estável ao ataque nucleofílico para a síntese do éster desejado.

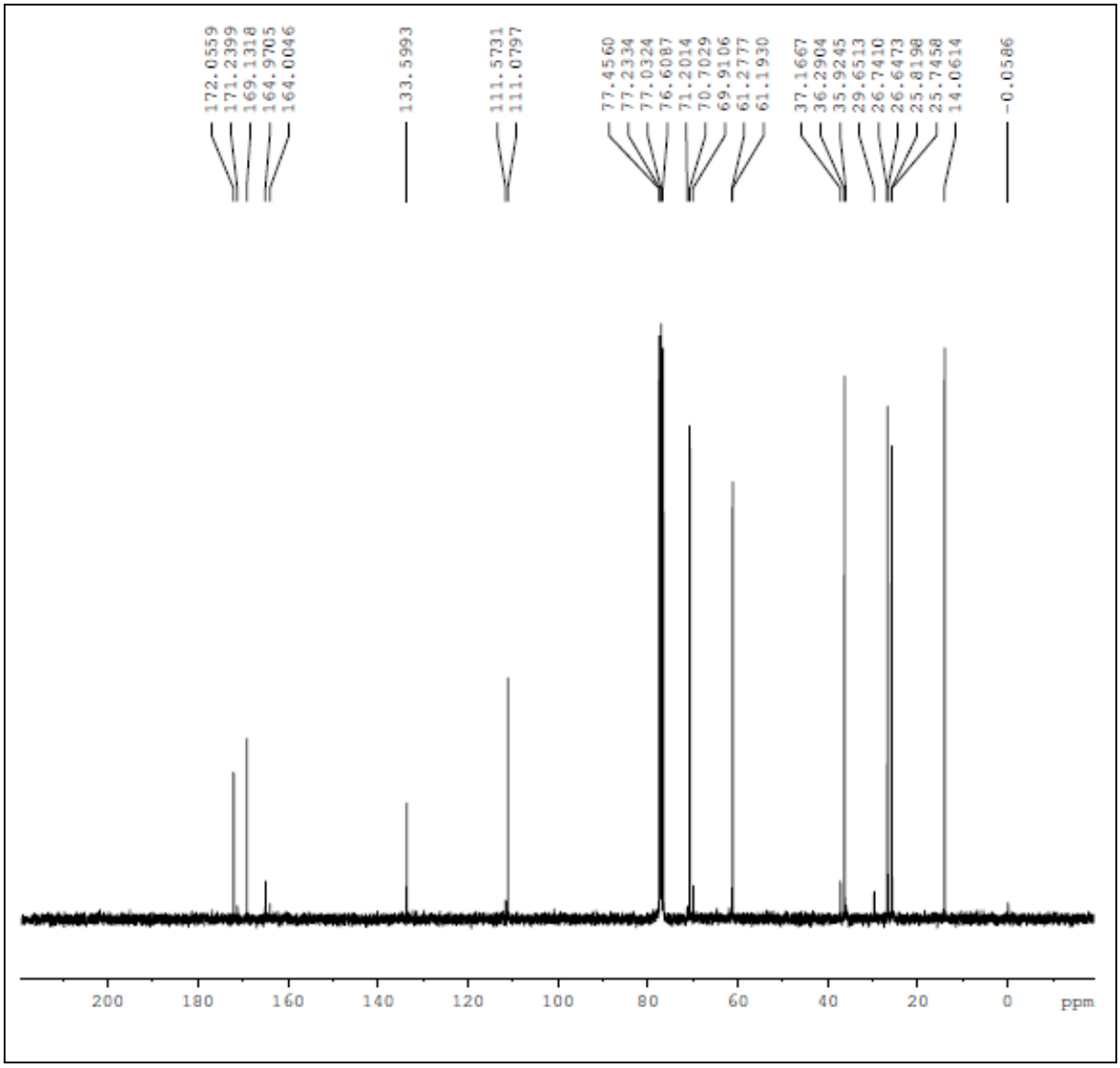




Espectro A.7: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre etilenodiamina e ácido málico protegido, obtido com cloroformato de etila e *N*-metilmorfolina.



AMP + cloroformato de etila
Intermediário de síntese obtido



Espectro A.8: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre etilenodiamina e ácido málico protegido, obtido com cloroformato de etila e *N*-metilmorfolina.

Os experimentos B1, B2 e B3, que utilizaram cloroformato de etila, permitiram reações mais limpas em relação àquelas que usam EDC. Entretanto, houve a formação do anidrido misto entre o ácido málico protegido e o agente condensante,

que se mostrou estável e não sofreu ataque nucleofílico do foco central (etilenodiamina, etilenoglicol ou glicerol). Desta forma, os intermediários de interesse não foram obtidos. Assim, optou-se pelo uso de 4-nitrofenilcloroformato como agente condensante para estas reações, considerando-se que o grupo nitrofenila atuará como melhor grupo de saída em relação ao grupo etila do cloroformato de etila, favorecendo o ataque nucleofílico pelo foco central.

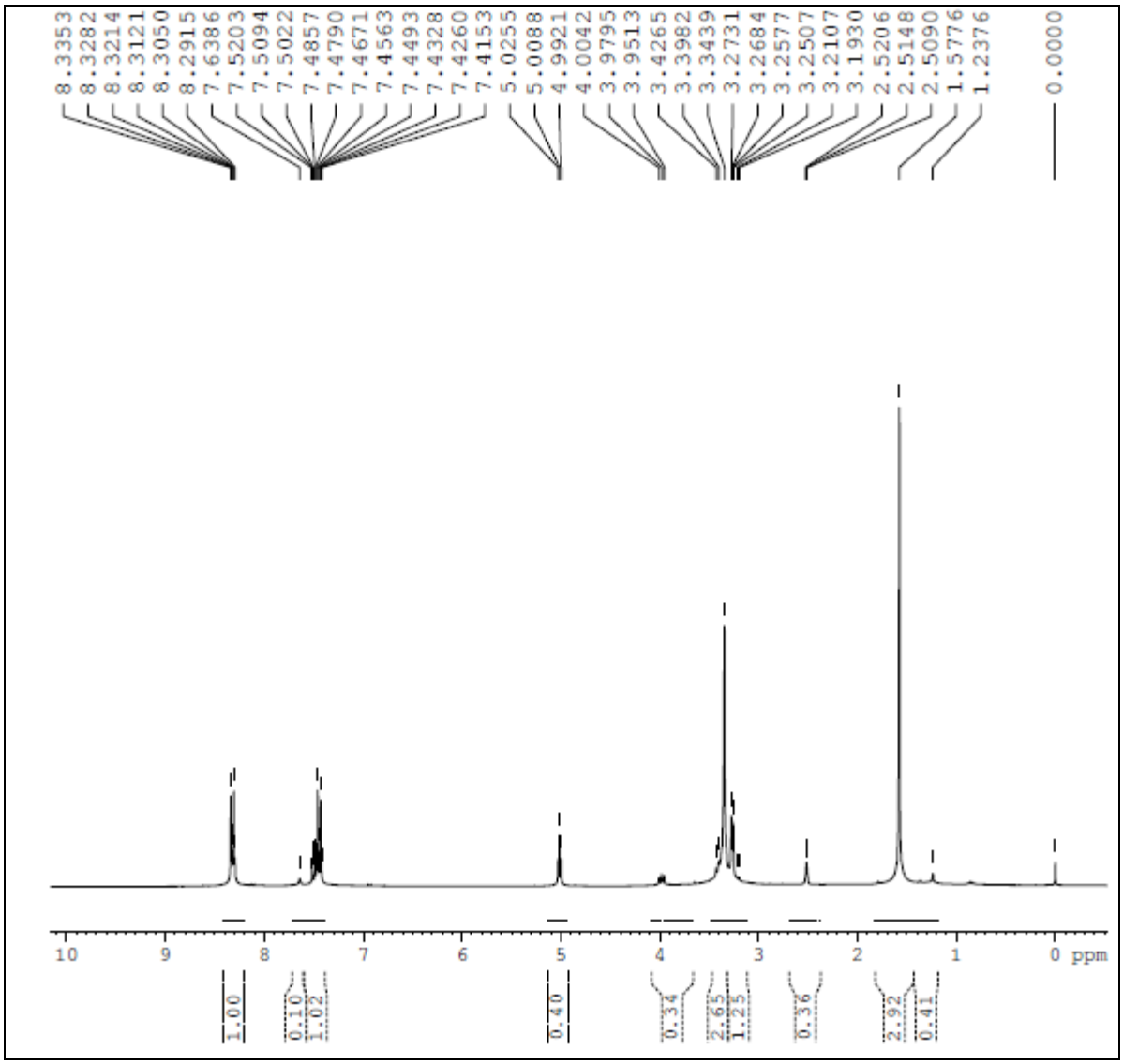
Os experimentos B4, B5, B6 e B7 utilizaram 4-nitrofenilcloroformato. O experimento B4 consiste no uso de etilenodiamina como foco central, utilizando-se a proporção molar utilizada de 1:2 (amina/ácido), com o intuito de obter as duas substituições possíveis. A cromatografia em camada delgada do produto obtido nesta reação apresentou mancha com R*f* de 0,46, diferente dos valores apresentados pelos materiais de partida, etilenodiamina, R*f* de 0,12, e ácido málico protegido, de R*f* 0,23, o que indica a obtenção de um produto com caráter mais apolar.

No entanto, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.9) do composto obtido apresentou a formação de outro anidrido misto, resultante da reação entre o grupo nitrofenila do 4-nitrofenilcloroformato e o ácido málico protegido. Este intermediário sintético faz parte do mecanismo das reações que utilizam o 4-nitrofenilcloroformato como agente condensante. No entanto, este anidrido deveria ter sofrido ataque nucleofílico da etilenodiamina, para obtenção da amida desejada, o que não ocorreu. No espectro de RMN 1H (Espectro A.9) é possível observar a presença deste intermediário de síntese e sinais na região de 7 e 8 ppm relacionados aos hidrogênios do grupo nitrofenila. Além disso, são evidentes os sinais referentes ao ácido málico protegido, em 1,50 ppm, relativos aos hidrogênios metilênicos da lactona, bem como os sinais deslocados para campo mais baixo, em 3,10 a 3,42 ppm, e, também, em 5,00 ppm, correspondentes aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 do agente espaçante, respectivamente. Em adição, no espectro não são observados os sinais relativos à etilenodiamina.

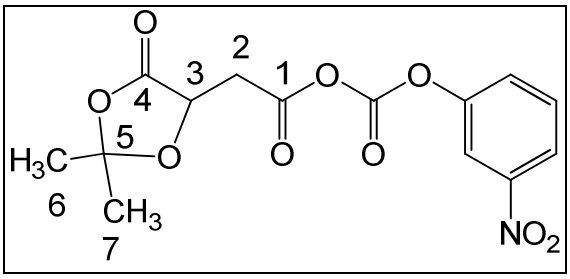
Outra evidência de que não se obteve o intermediário IA foi espectro de RMN ^{13}C (Espectro A.10), que apresentou sinais referentes ao intermediário sintético em 148,50 ppm, relacionado à carbonila do anidrido, além dos sinais entre 122,88 e 155,15 ppm, correspondentes aos carbonos do grupo nitrofenila presentes no anidrido misto. Além disso, é possível observar os carbonos relativos ao ácido málico protegido em 25,39 e 26,31 ppm e em 110,76 ppm, referentes aos carbonos

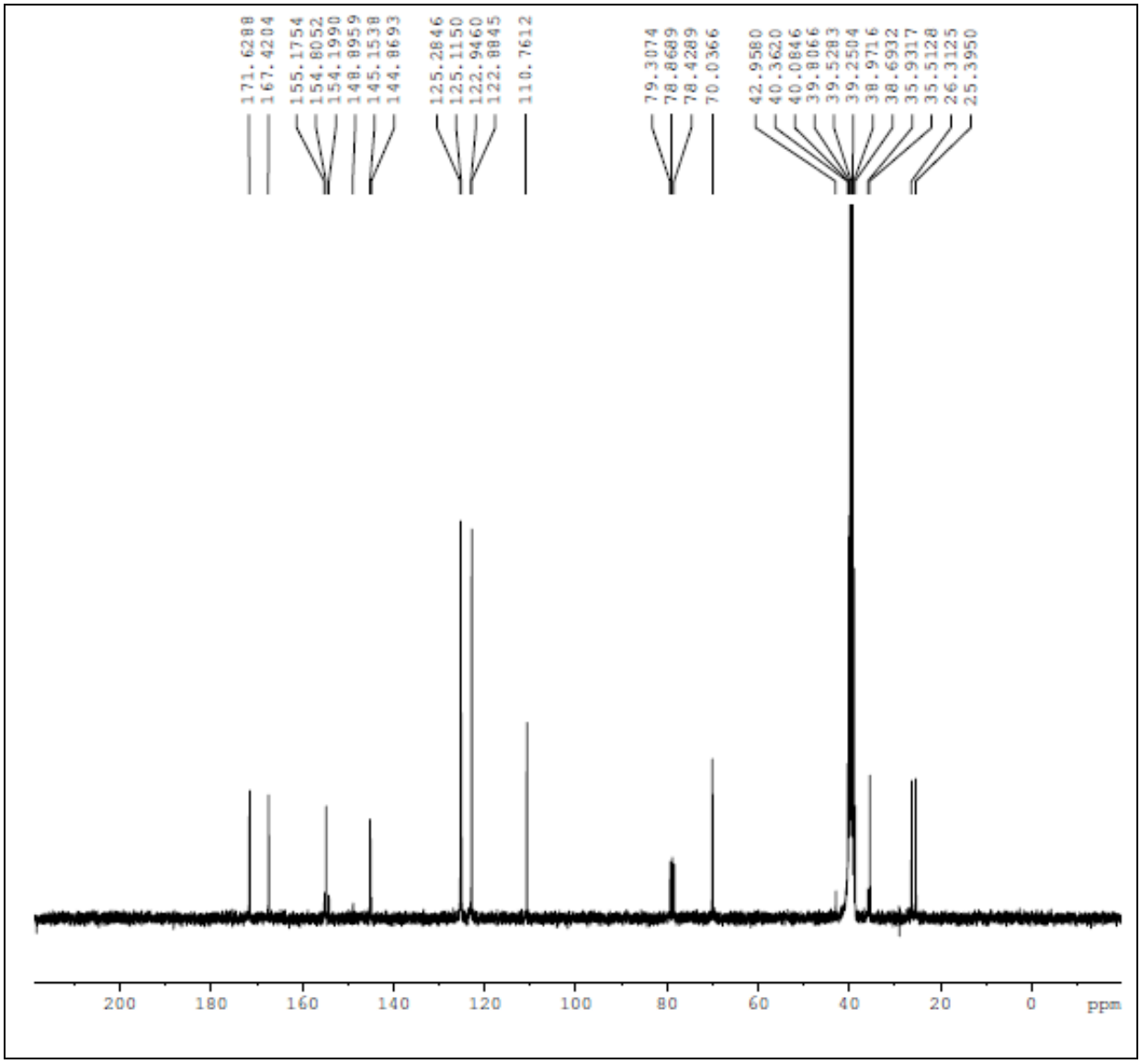
6 e 7 do agente espaçante. Ainda, observam-se sinais dos carbonos 2 e 3 na região de 35 e 79 ppm, bem como os sinais das carbonilas do agente espaçante, em 167,42 ppm e em 171,62 ppm, referentes, respectivamente, aos carbonos carbonílicos ligados ao anel nitrado e à lactona. Contudo, esses resultados revelam, novamente, a obtenção de anidrido misto estável, agora formado pelo grupo nitrofenila e ácido málico protegido, que não foi substituído pela etilenodiamina para a síntese do intermediário IA desejado.

Com o intuito de prover condições mais drásticas para favorecer a substituição, optou-se pela realização do experimento B5 em que algumas condições reacionais foram alteradas, como aumento do tempo de reação para 48 horas e, também, a temperatura reacional para 55 ºC. Entretanto, o resultado foi o mesmo obtido com o experimento B4, ou seja, a obtenção de anidrido misto estável, que não sofreu ataque nucleofílico da etilenodiaminapara a formação do composto de interesse.



Espectro A.9: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação entre etilenodiamina e ácido málico protegido, obtido com 4-nitrofenilcloroformato e *N*-metilmorfolina, experimento B4.





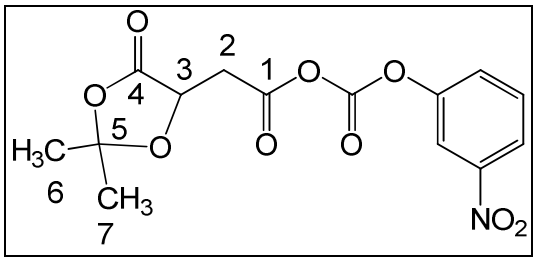
Espectro A.10: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação entre etilenodiamina e ácido málico protegido, obtido com 4-nitrofenilcloroformato e *N*-metilmorfolina, experimento B4.

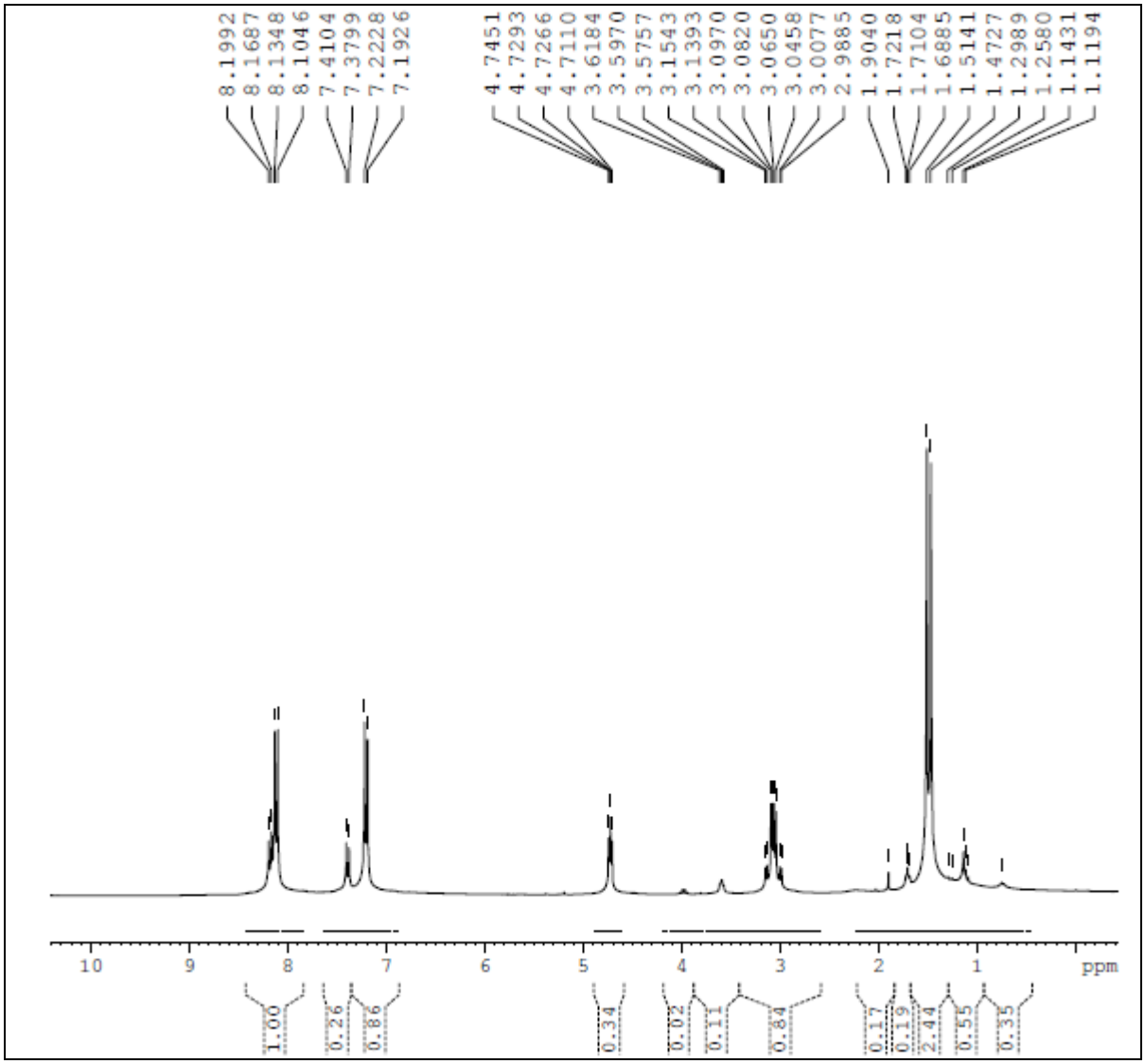
Os experimentos B6 e B7 utilizaram, respectivamente, etilenoglicol e glicerol como focos centrais, nas proporções molares de 1:2 (etilenoglicol e ácido málico protegido) e 1:3 (glicerol e AMP), respectivamente. Também, utilizando 4-nitrofenilcloroformato como agente de acoplamento. A cromatografia em camada delgada de ambas as reações mostraram mancha com R*f* de 0,46, mesmo valor apresentado pelo anidrido misto formado pelo ácido málico protegido e o grupo nitrofenila, do agente condensante.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.11) do composto obtido pelo experimento B6 apresentou a formação do intermediário de síntese devido à ausência de sinais do foco central etilenoglicol em 4,30 ppm. Ademais, no espectro é possível observar os sinais relativos a este intermediário na região de 7 e 8 ppm, que correspondem aos hidrigênios do anel aromático nitrado. Os sinais referentes aos hidrogênios do espaçante ligado ao grupo nitrofenila são evidentes em 1,50 ppm, nas regiões de 3,00 e 4,70 ppm, que correspondem, respectivamente, aos hidrogênios H_6 e H_7, H_2 e H_3 do ácido málico protegido. Dessa maneira, assim como para o foco central etilenodiamina, não houve o ataque nucleofílico do etilenoglicol ao anidrido misto, evidenciando que o intermediário IB de interesse não se formou.

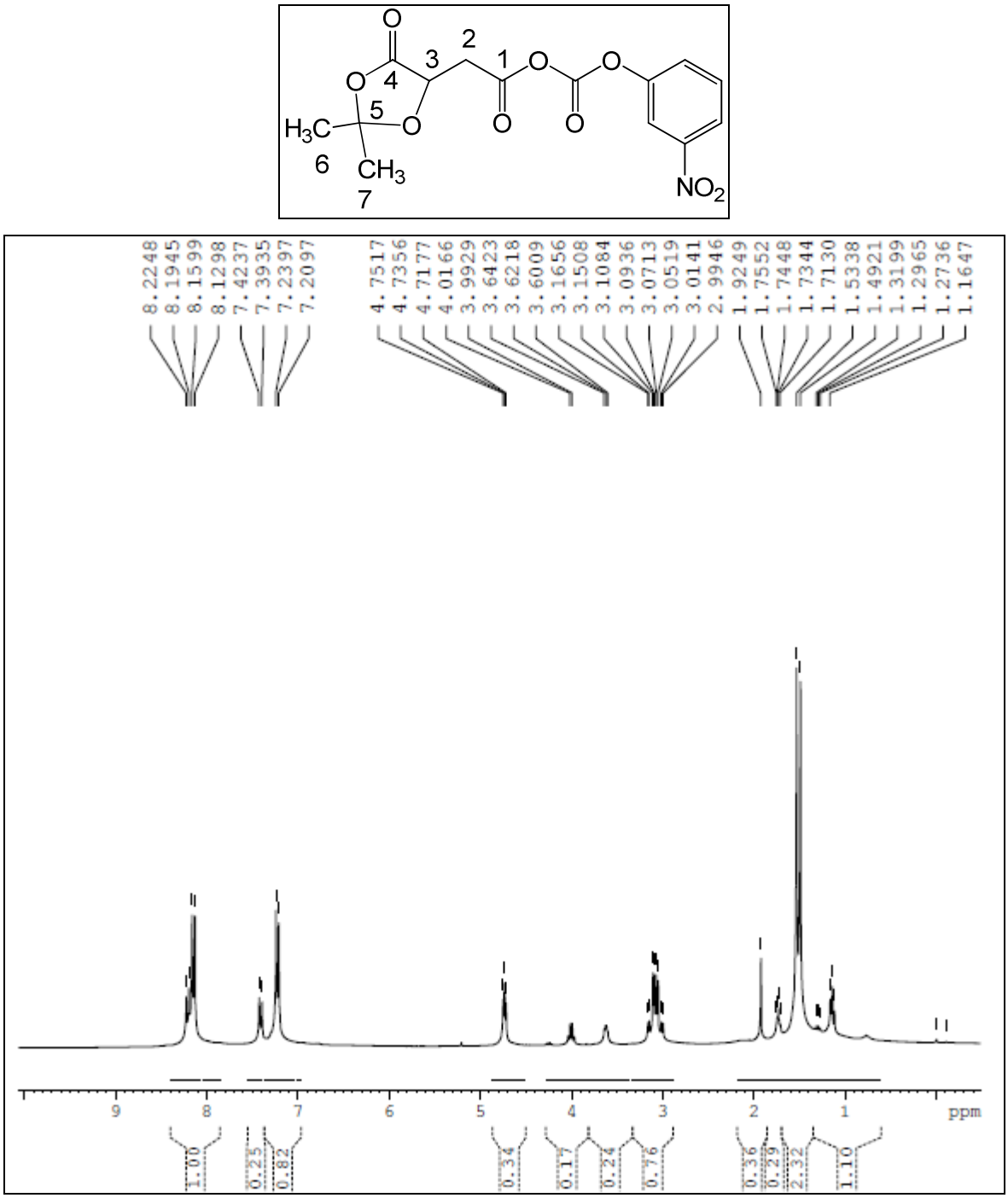
O mesmo resultado foi obtido com a realização do experimento B7. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.12) do produto obtido nesse experimento não mostra sinais dos hidrogênios relativos ao foco central, glicerol na região de 4,30 e 5,10 ppm. Além disso, observam-se os sinais já discutidos referentes ao anidrido misto, relativos ao grupo nitrofenila entre 7 e 8 ppm, bem como os sinais do ácido málico protegido em 1,49 e 1,53 ppm, e na região de 3,00 e 4,70 ppm, relacionados aos hidrogênios H_6 e H_7, H_2 e H_3 do agente espaçante. Portanto, este experimento não foi eficiente para a obtenção do intermediário IC desejado.

Os resultados obtidos pelos experimentos B4, B5, B6 e B7 mostraram que a troca do agente condensante, de cloroformato de etila para 4-nitrofenilcloroformato, e também, alteração nas condições reacionais, tais como aumento no tempo e temperatura da reação, não geraram os resultados esperados. Em nenhum dos casos, o álcool ou a amina realizou o ataque nucleofílico no anidrido misto, não havendo a formação dos intermediários de interesse.





Espectro A.11: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre etilenoglicol e ácido málico protegido, obtido com 4-nitrofenilcloroformato e *N*-metilmorfolina, experimento B6.



Espectro A.12: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre glicerol e ácido málico protegido, obtido com 4-nitrofenilcloroformato e *N*-metilmorfolina, experimento B7.

❖ Método C - DCC como gente condensante

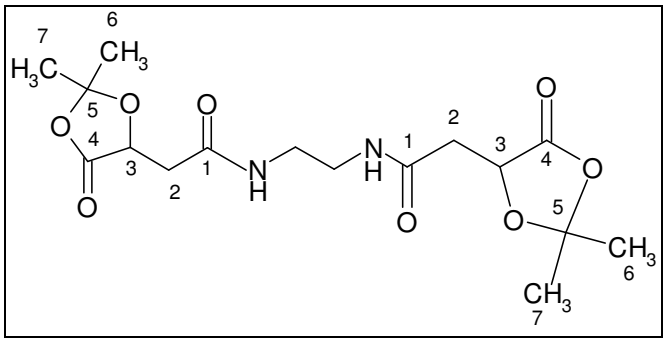
Devido à dificuldade de síntese dos intermediários de interesse, utilizando cloroformato de etila e 4-nitrofenilcloroformato, optou-se pelo uso de DCC como agente condensante. Para o método C realizaram-se os experimentos com etilenodiamina e glicerol, como focos centrais, para obtenção dos intermediários 1A e 1C.

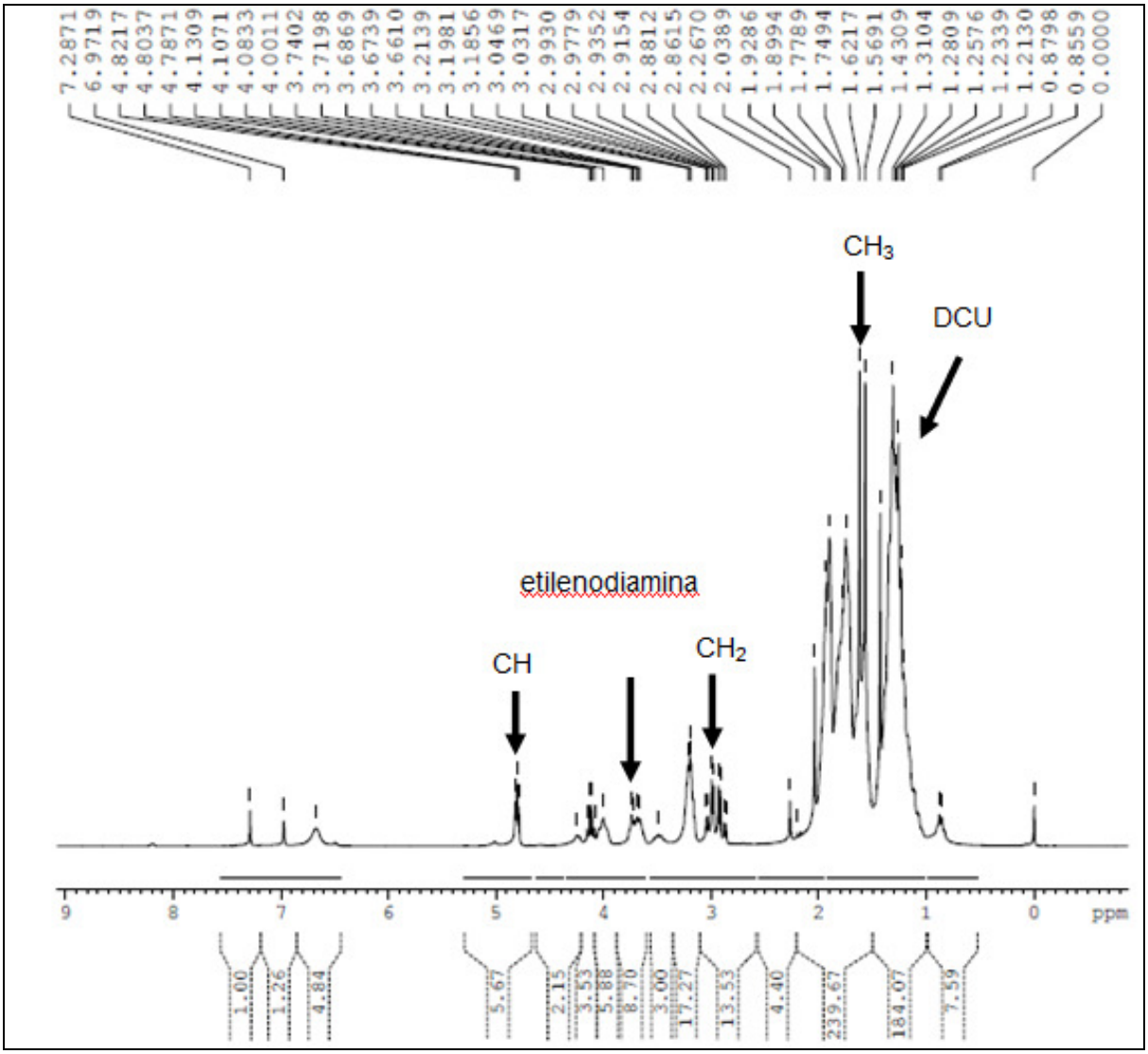
⇒ Etilenodiamina – Experimento C1

A reação foi realizada na proporção molar 2:1 de ácido málico protegido e etilenodiamina, respectivamente, para obtenção do maior grau de substituição na formação da amida de interesse.

A cromatografia em camada delgada do produto obtido pelo experimento C1 mostrou a formação de duas manchas com valores de R*f* diferentes dos materiais de partida, etilenodiamina (R*f* 0,12) e ácido málico protegido (R*f* 0,23). A mancha mais polar com R*f* de 0,46 pode estar relacionada ao subproduto DCU, obtido nas reações de DCC. Enquanto, a mancha que apresenta R*f* de 0,81, indica a formação do composto de interesse.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.13) do composto obtido nesta reação apresenta excesso de sinais, principalmente, na região entre 1,00 e 2,00 ppm, referentes ao subproduto DCU. Entretanto, é possível observar no espectro a presença de sinais relativos ao ácido málico protegido em 1,56 e 1,62 ppm, que correspondem aos hidrogênios metilênicos da lactona, bem como os sinais entre 2,86 e 3,04 ppm e em 4,78 ppm, que podem ser relativos aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 do espaçante. Ademais, os sinais na região de 3,60 ppm podem corresponder aos hidrogênios do foco central, etilenodiamina. O que sugere a obtenção do intermediário IA por este método, mesmo que impuro.





Espectro A.13: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre etilenodiamina e ácido málico protegido, obtido com o uso de DCC como agente condensante, experimento C1.

⇒ Glicerol – Experimento C2

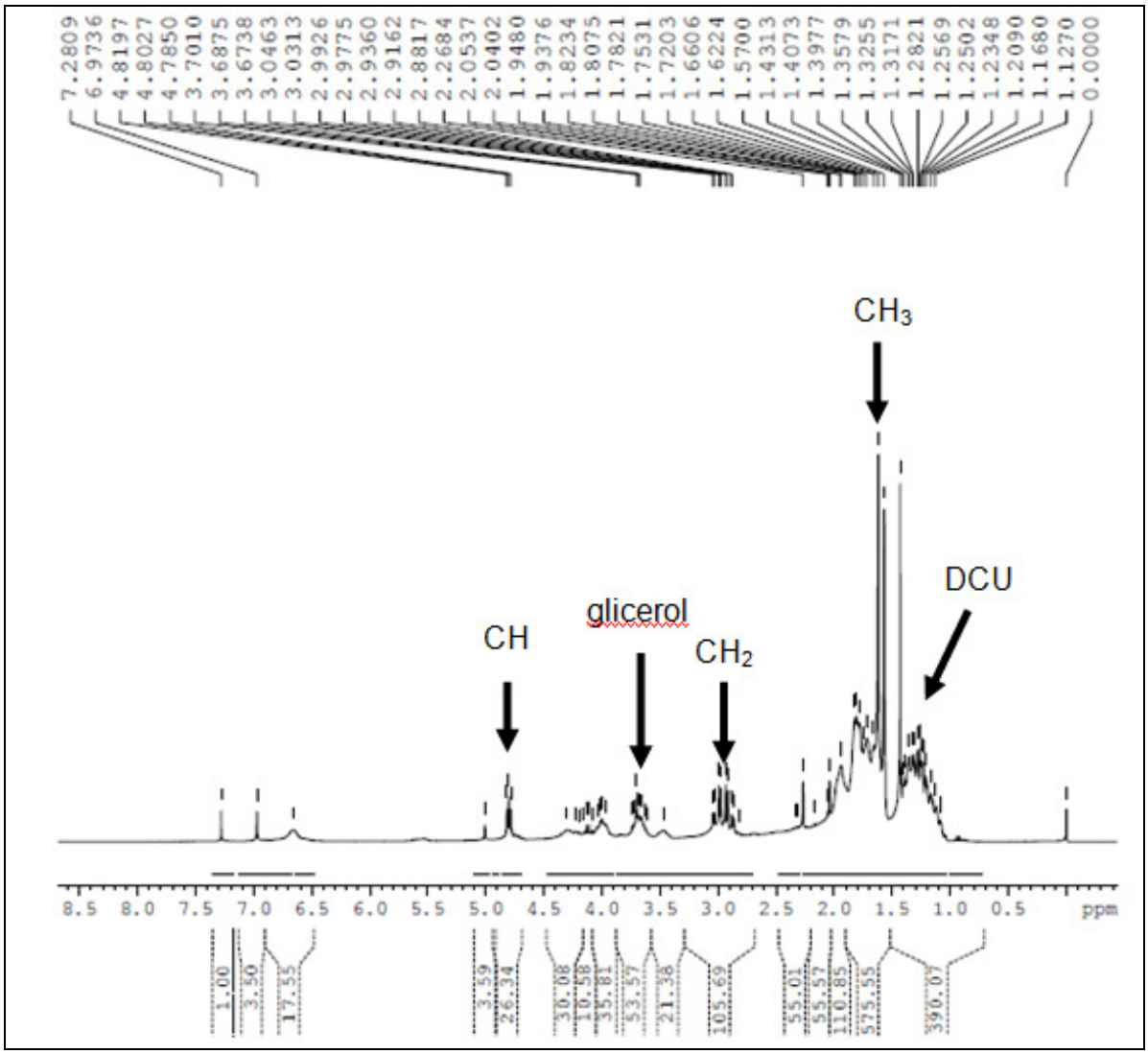
A proporção molar utilizada para esta reação foi de 3:1, respectivamente, para o ácido málico protegido e glicerol, com o objetivo de obter as três substituições possíveis.

Após 24 horas de reação, a cromatografia de camada delgada apresentou três manchas com R*f* equivalentes a 0,23, 0,49 e 0,80. A mancha com menor R*f* deve estar relacionada ao material de partida, ácido málico protegido. A segunda mancha, provavelmente, é relativa ao DCU. A mancha com R*f* 0,80 indica a formação de um composto com caráter mais apolar, o que é desejável.

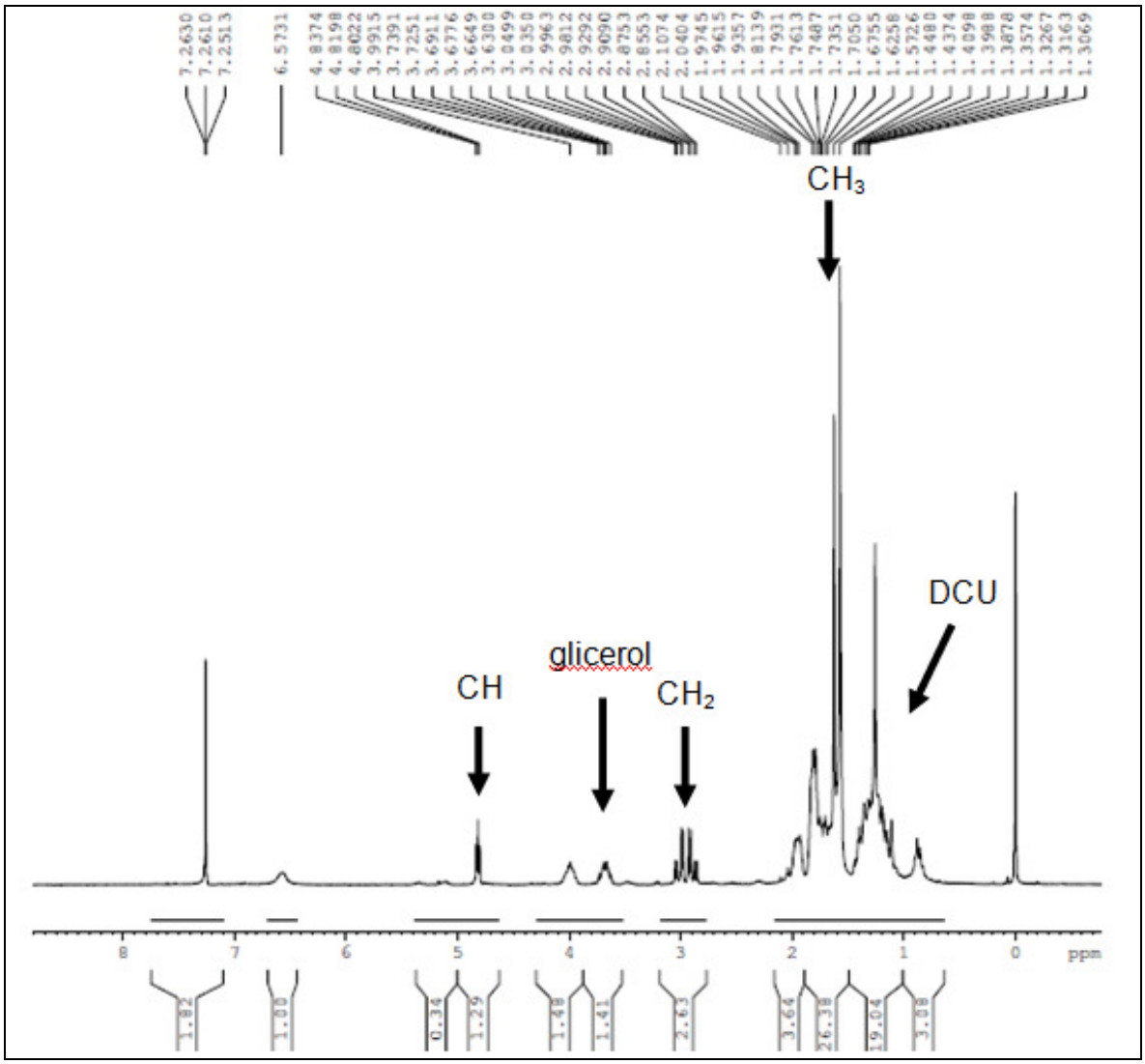
O espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.14) do composto obtido pelo experimento C2 apresentou excesso de sinais na região de 1 e 2 ppm, relacionados ao DCU. Ademais, este espectro mostrou indícios de formação do intermediário IC, devido à presença de sinais em 3,60 ppm e na região 4 ppm, indicativos de hidrogênios do glicerol. No espectro, também, é possível observar a presença dos sinais do ácido málico protegido em 1,57 e 1,62 ppm, e na região de 2,88 e 3,04 ppm, e em 4,78 ppm, que podem ser relativos, respectivamente, aos hidrogênios H_6 e H_7, H_2 e H_3 do agente espaçante.

Com os indícios de obtenção do intermediário IC pelo experimento C2, realizou-se tentativa de purificação por coluna cromatográfica com gradiente de concentração. O eluente utilizado foi hexano/acetato de etila em gradiente de concentração, com variação de 10% na concentração do solvente a cada adição, portanto, as proporções variaram de 100:0 até 0:100, respectivamente. A coluna isolou mancha que na cromatografia em camada delgada apresentou R*f* de 0,80.

Apesar de menos impuro, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.15) da fração isolada ainda mostrou a presença dos sinais na região de 1 e 2 ppm, característicos do DCU. No entanto, é possível observar com mais clareza a presença dos sinais do intermediário IC em 3,60 referente ao hidrogênio H_{2A}, bem como sinais em 4,30 ppm relativos aos hidrogênios H_{2A} e H_{2A} do glicerol. Além destes, observam-se sinais característicos do agente espaçante em 1,56-1,62 ppm, na região de 2,80 a 3,00 ppm e em 4,70 ppm, que correspondem, respectivamente, aos hidrogênios H_6 e H_7, H_2 e H_3 do ácido málico protegido.



Espectro A.14: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre glicerol e ácido málico protegido, obtido com o uso de DCC como agente condensante, experimento C2.



Espectro A.15: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto da reação entre glicerol e ácido málico protegido, obtido com o uso de DCC, pelo experimento C2, fração isolada na coluna cromatográfica.

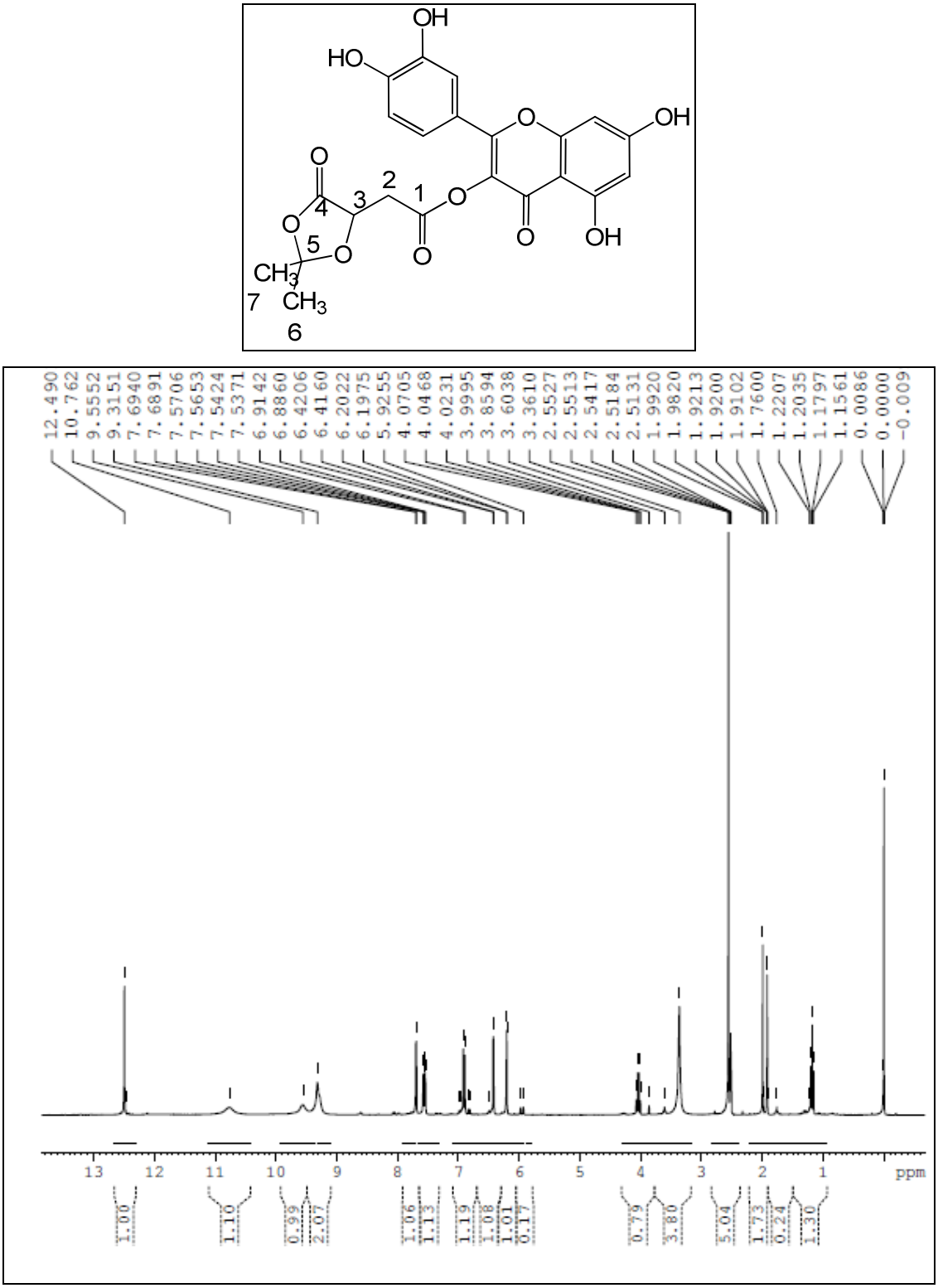
A.4.1.2 *Síntese do dendrímero dirigido de quercetina pelo método convergente (foco central, inositol)*

O método convergente consiste na síntese das ramificações (*dendrons*), que, posteriormente, são ligadas ao núcleo para a construção do dendrímero. Esta abordagem facilita a remoção de subprodutos (JESUS, 2003).

A.4.1.2.1 *Síntese do intermediário II (Figura A.12)*

O intermediário II é formado pela reação de esterificação entre quercetina e ácido málico protegido. Este composto foi planejado para a síntese do dendrímero dirigido de primeira geração de quercetina pelo método convergente, utilizando-se *N*-metilmorfolina e cloroformato de etila.

O espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.16) do produto obtido desta reação mostrou a presença de sinais entre 6 e 7 ppm, que podem estar relacionados aos hidrogênios da quercetina. Neste espectro, também, é possível observar a presença de singletos, deslocados para campo mais baixo entre 1 e 2 ppm, que podem ser referentes aos hidrogênios metilênicos do ácido málico protegido, bem como o sinais na região de 4,00 ppm, que podem estar relacionados aos hidrogênios do carbono 3 do agente espaçante. Portanto, nesta reação há evidências de que o intermediário II (quercetina-ácido málico protegido) foi obtido. Entretanto, este composto necessita de purificação e caracterização mais acurada.



Espectro A.16: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, DMSO-d_6) do produto impuro da reação entre quercetina e ácido málico protegido (intermediário II), obtidos com cloroformato de etila e *N*-metilmorfolina.

A.4.1.3 *Síntese do dendrímero dirigido de 3-hidroxiflavona pelo método convergente (foco central, inositol)*

A.4.1.3.1 *Síntese do intermediário III (Figura A.13)*

O intermediário III é formado pela esterificação entre o álcool e ácido carboxílico da 3-hidroxiflavona e ácido málico protegido, respectivamente. O composto foi planejado para a síntese do dendrímero dirigido de primeira geração de 3-hidroxiflavona pelo método convergente.

A cromatografia de camada delgada do intermediário III sintetizado mostrou duas manchas com R*f* iguais a 0,61 e 0,76. Estes valores foram diferentes dos observados para os materiais de partida 3-hidroxiflavona, 0,81 e ácido málico protegido, 0,23, o que é indicativo de que o intermediário III desejado foi obtido. Este produto foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando eluente hexano/acetato de etila com gradiente de concentração dos solventes, como o descrito anteriormente.

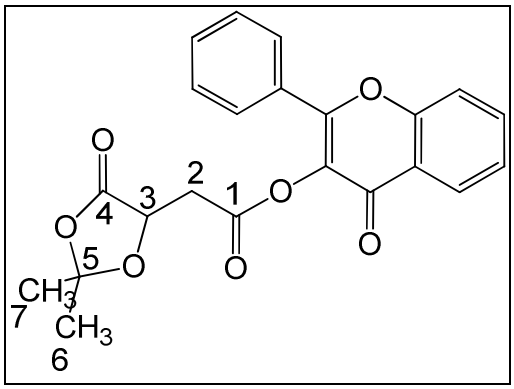
O espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.17) apresentou sinais em 1,55 e 1,59 ppm, relacionados às metilas da lactona presente na proteção do ácido málico protegido. Os sinais próximos de 3,25 e em 4,80 ppm, relativos aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 do agente espaçante, e os sinais na região de 7-8 ppm se referem aos hidrogênios característicos dos anéis aromáticos da 3-hidroxiflavona. Esses sinais sugerem que o intermediário III foi obtido.

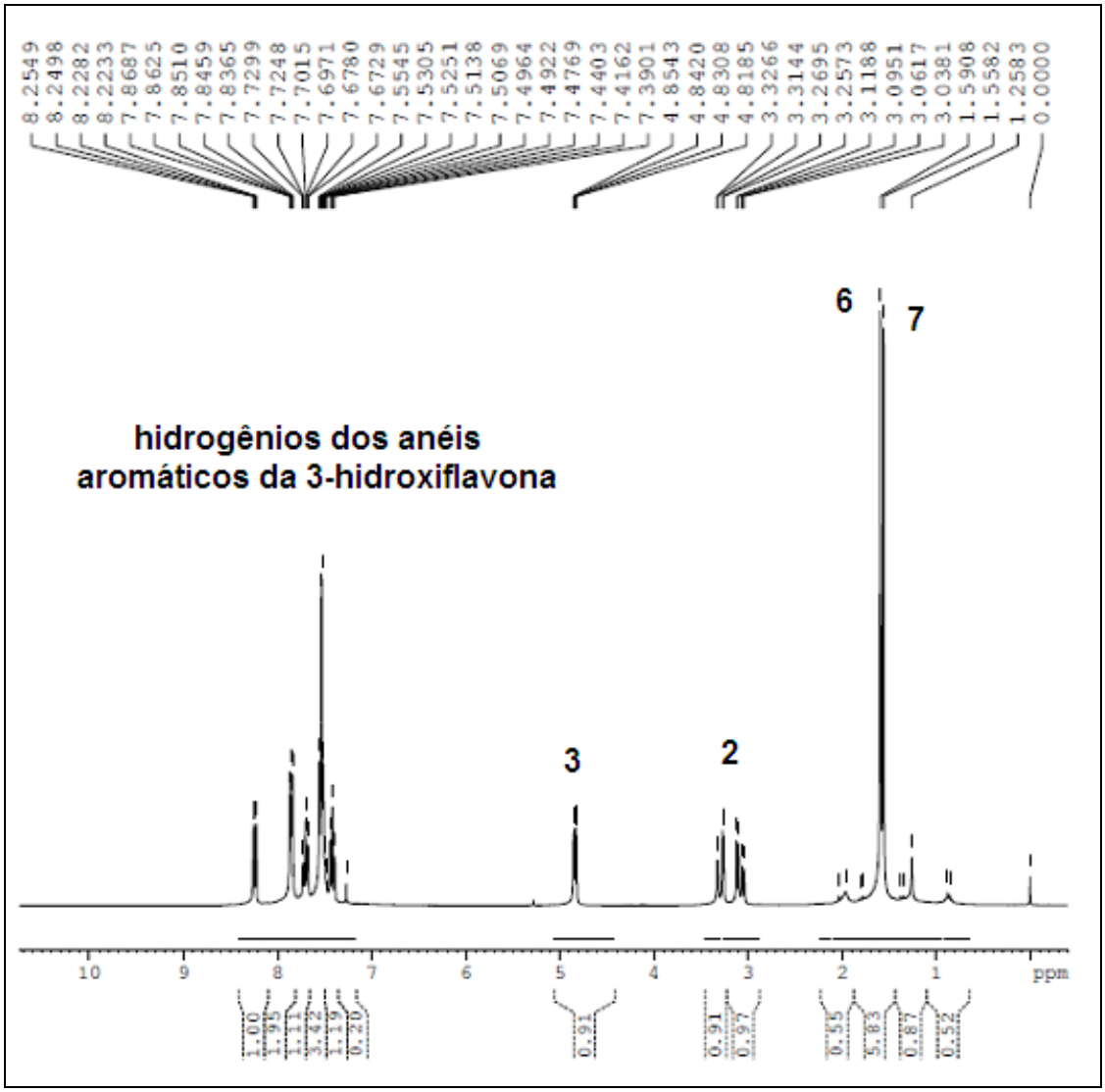
Além disso, observaram-se no espectro de RMN ^{13}C (Espectro A.18) sinais relacionados ao intermediário III, como em 25,82 e 26,78 ppm, correspondentes às metilas do ácido málico protegido. Ainda em relação ao espaçante, os sinais em 36,24 (C_5), em 70,55 (C_2) e em 111,39 (C_3) ppm o caracterizam. Em adição, existem sinais na região entre 118-155 ppm, indicativos da presença da 3-hidroxiflavona. Ainda em relação ao espectro de RMN ^{13}C, observam-se sinais em 171,61 ppm, relativos à função éster formada entre o álcool da 3-hidroxiflavona e o ácido carboxílico do ácido málico protegido.

O espectro no IV (Espectro A.19) é mais uma evidência de obtenção do intermediário III. Neste espectro, observam-se bandas de estiramento relacionadas à 3-hidroxiflavona em 3070, 1628 e 1566 cm^{-1} referentes, respectivamente, a CH aromático, carbonila e ao alceno da 3-hidroxiflavona, bandas que caracterizam a presença deste composto bioativo. Também, observam-se bandas fortes de

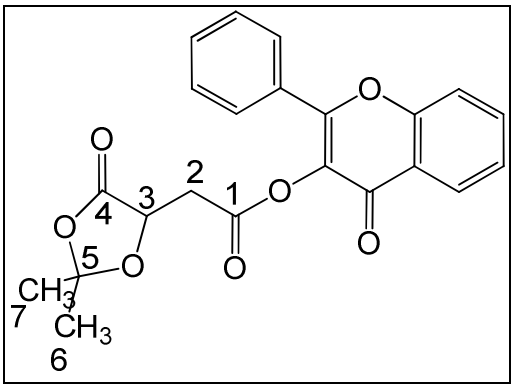
estiramento de CH alifático em 2938 e 2989 cm^{-1}, relativas às metilas da lactona. Em adição, são evidentes as bandas em 1787 e 1762 cm^{-1}, relacionadas à presença de carbonila de lactona e da função éster formada, respectivamente.

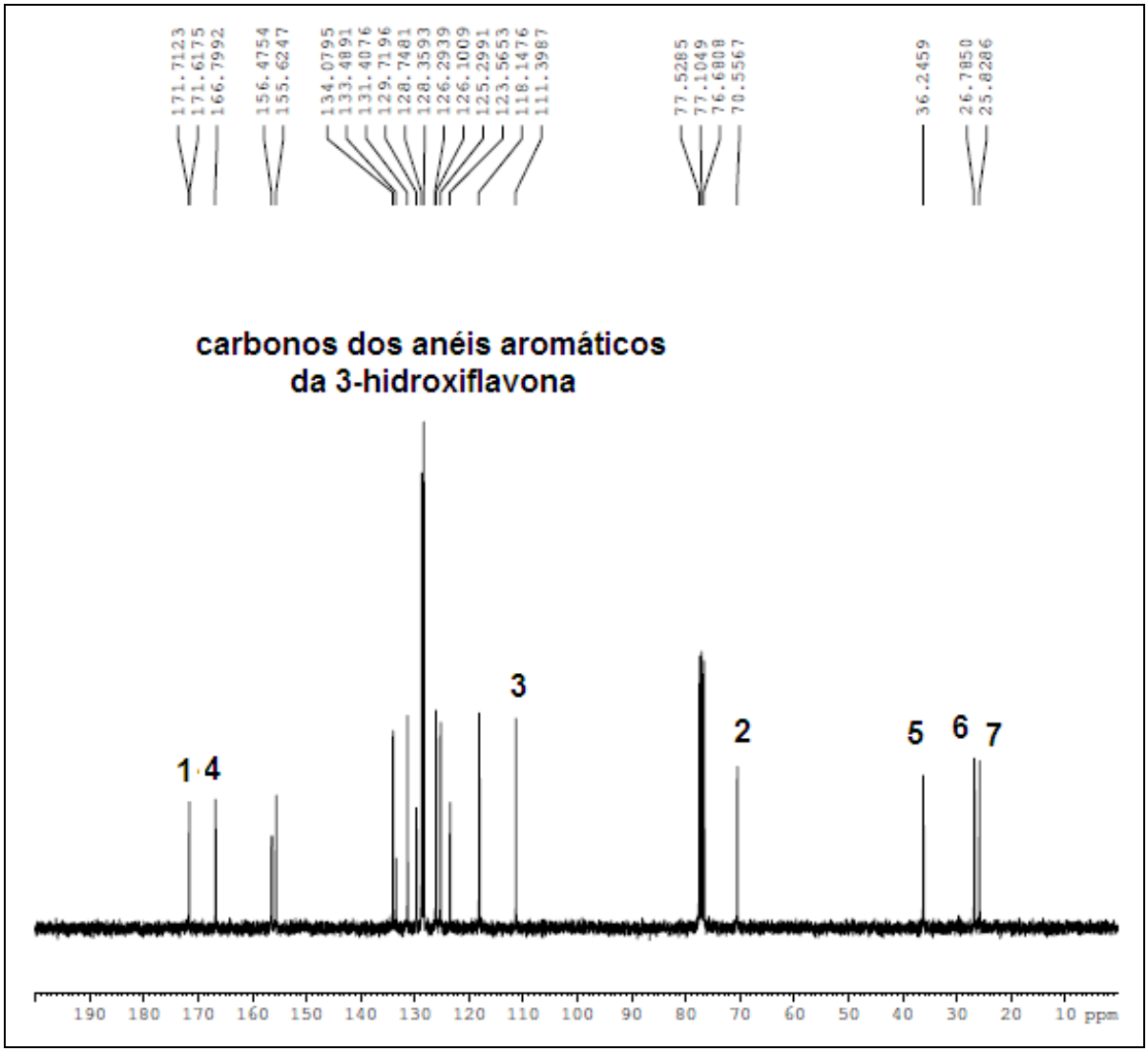
O produto final tem como características um sólido amorfo amarelo claro, solúvel em clorofórmio e diclorometano.



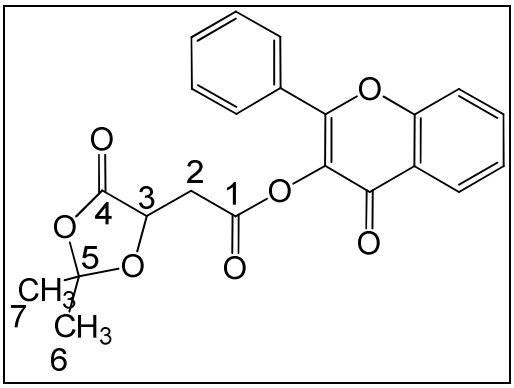


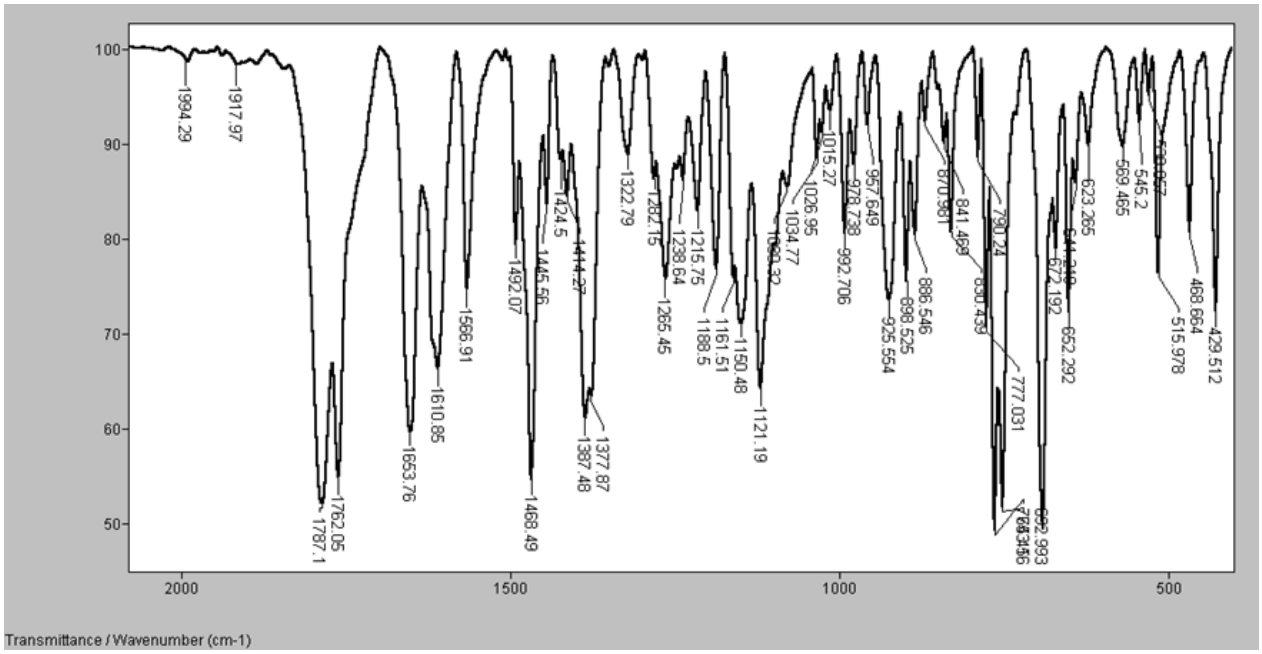
Espectro A.17: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) do intermediário III.





Espectro A.18: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do intermediário III.





Espectro A.19: Espectro no IV do intermediário III (3-hidroxiflavona e ácido málico).

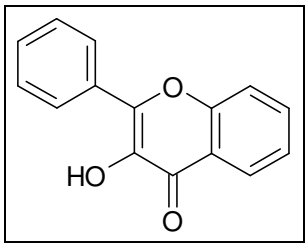
IV (ν, KBr, cm^{-1})
3070 (ν_{CH} aromáticos); 2989 e 2938 (ν_{CH3} lactona); 1787 ($\nu_{C=O}$ lactona); 1762 ($\nu_{C=O}$ éster); 1653 ($\nu_{C=O}$ de flavona); 1566 ($\delta_{C=C}$ alcenos); 1468 (δ_{CH2} angular assimétrica); 1215 (ν_{C-O} éster); 777 (δ_{CH2} angular assimétrica).

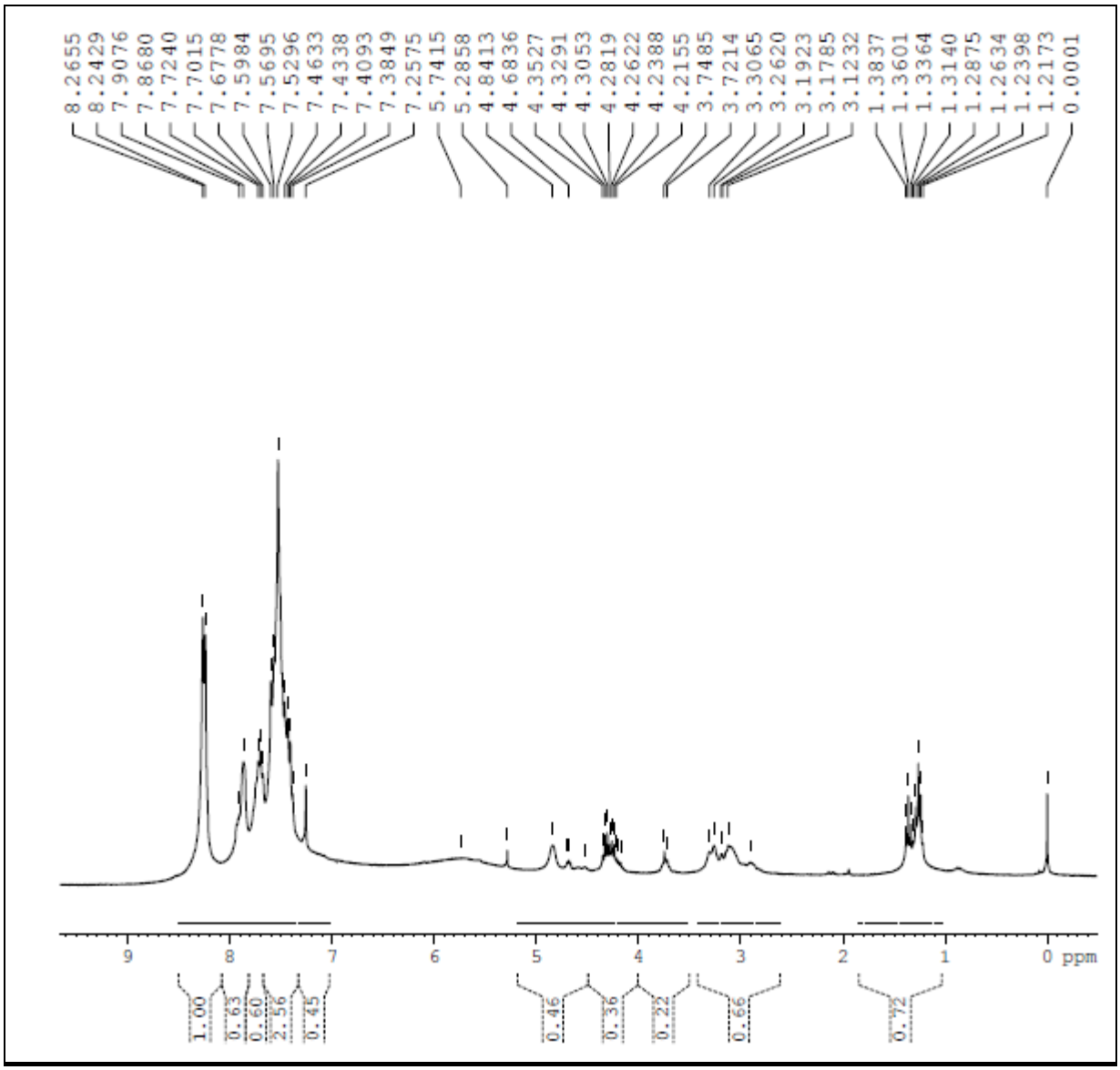
A.4.1.3.2 *Desproteção do intermediário III, obtenção do intermediário IV*

Com a obtenção do intermediário III, partiu-se para a etapa seguinte, a síntese do intermediário IV. Esta etapa consiste na desproteção dos grupos álcool e ácido carboxílico do ácido L(-)-málico protegido (Figura A.14)

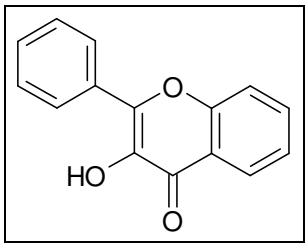
A.4.1.3.2.1 Método D

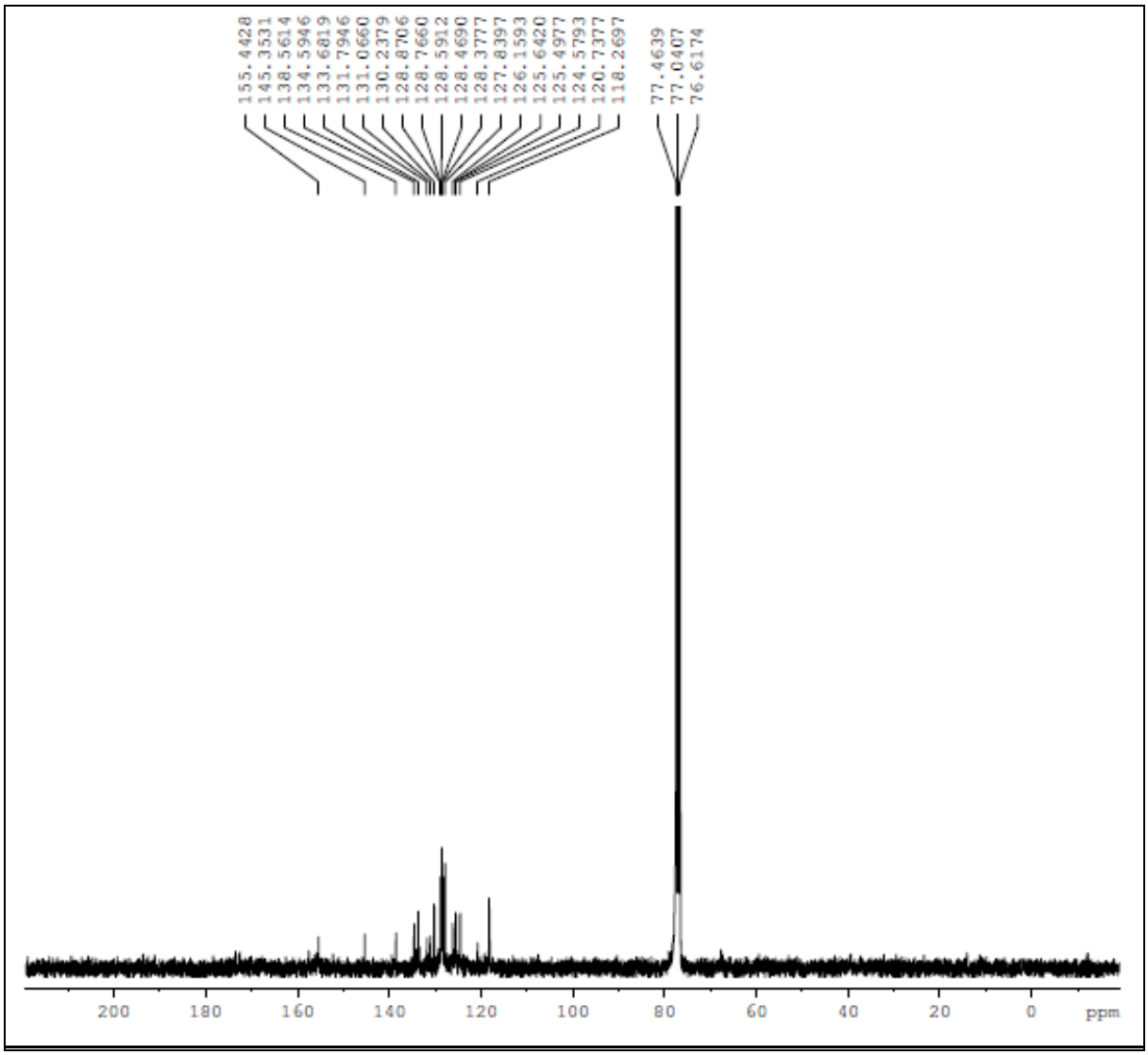
Após os 15 minutos de reação, a CCD mostrou duas manchas com R*f* 0,61 e 0,81, a primeira delas provavelmente relacionada ao intermediário III, que não sofreu a hidrólise da lactona, e a segunda ao material de partida 3-hidroxiflavona, com igual R*f*. O espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.20) mostra a manutenção dos sinais da 3-hidroxiflavona na região entre 7-8 ppm. No espectro, não se observam sinais em 1,59 e 1,62 ppm, possivelmente, relativos aos hidrogênios das metilas do ácido málico protegido, o que sugere a hidrólise da proteção. Ainda em relação ao espaçante, apareceram sinais que podem estar relacionados aos hidrogênios dos C_2 e C_3 do ácido málico na região de 3,13 e 4,84 ppm, respectivamente. Entretanto, no espectro de RMN ^{13}C (Espectro A.21) apareceram apenas os sinais característicos da 3-hidroxiflavona na região de 118-157 ppm, sem os sinais que caracterizam os carbonos do ácido málico protegido na região de 70 e 110 ppm. Ainda no espectro de RMN ^{13}C, não apareceram sinais da carbonila formada pela ligação éster originada, o que indica que este método promoveu tanto a hidrólise da proteção do ácido málico protegido quanto a clivagem da ligação éster formada.





Espectro A.20: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre 3-hidroxiflavona e ácido málico, obtido após a hidrólise da lactona, com o método D.





Espectro A.21: Espectro de RMN ^{1}H (75 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre 3-hidroxiflavona e ácido málico, obtido após a hidrólise da lactona, com o método D.

A.4.1.3.2.2 Método E

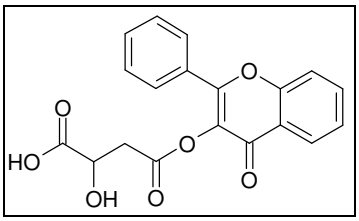
O método E consiste na utilização de ácido *p*-toluenossulfônico para a desproteção do intermediário III. A cromatografia em camada delgada desta reação mostrou a formação mancha com valor de R*f* igual a 0,81, como o apresentado pela 3-hidroxiflavona, e também, o desaparecimento da mancha do material de partida, indicando a ocorrência de hidrólise do éster que liga o ácido málico protegido a 3-hidroxiflavona, não havendo a formação do intermediário IV desejado.

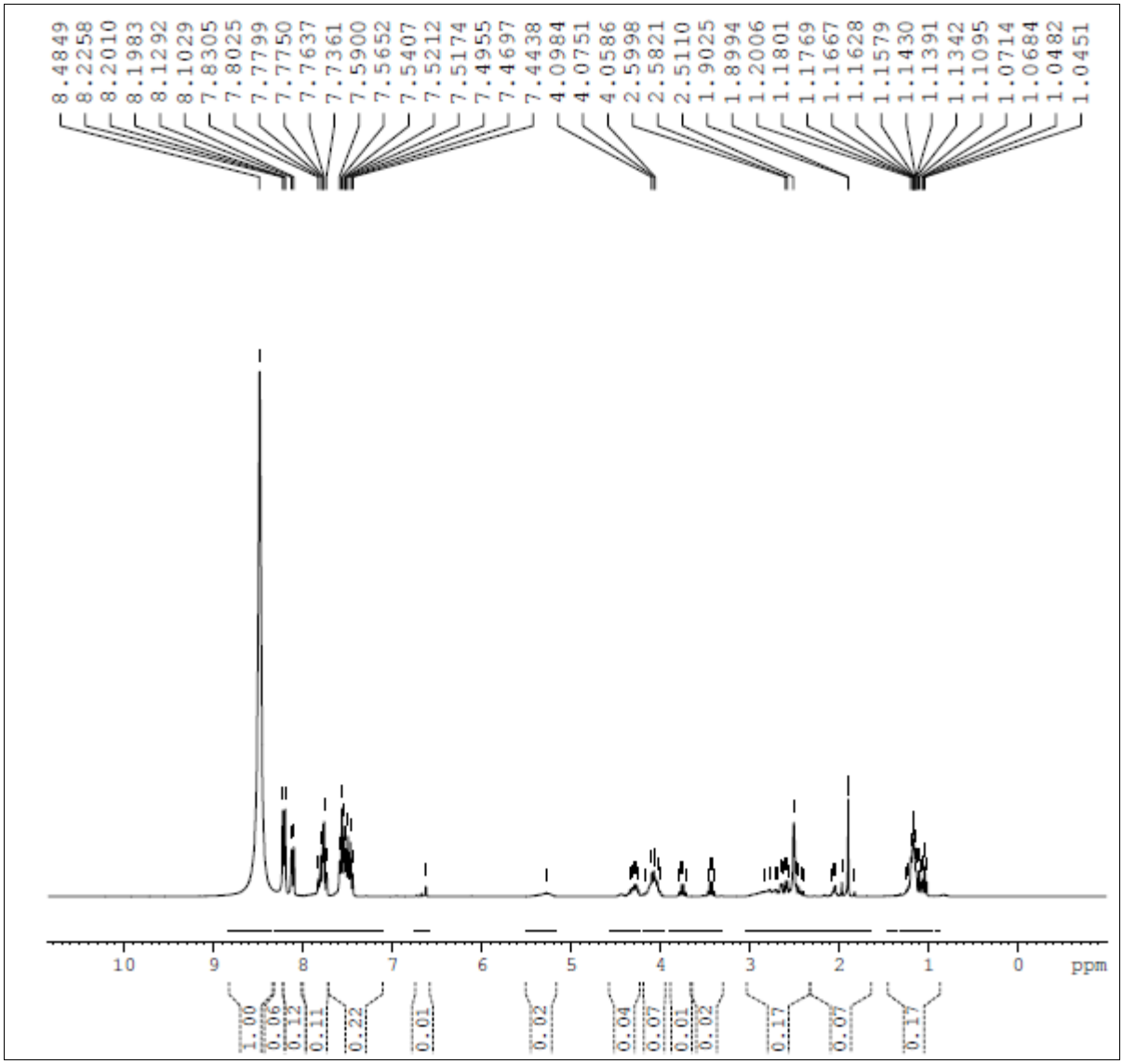
A.4.1.3.2.3 Método F

Para o método F utilizou-se solução de hidróxido de sódio 1M, como tentativa de hidrólise básica da lactona para a desproteção do intermediário III. Entretanto, após 10 minutos de reação, a cromatografia em camada delgada mostrou mancha com o mesmo valor de R*f* da 3-hidroxiflavona (0,81), bem como o desaparecimento da mancha do material de partida (intermediário III), o que indica que as condições reacionais utilizadas neste método foram muito drásticas e promoveram a hidrólise do éster formado entre a 3-hidroxiflavona e o ácido málico protegido. Portanto, este método não foi eficiente para a desproteção da lactona do intermediário III e consequente obtenção do intermediário IV.

A.4.1.3.2.4 Método G

Com o método G, após 22 horas de reação, a cromatografia em camada delgada mostrou duas manchas com R*f* iguais a 0,53 e 0,61, sendo que a segunda pode estar relacionada ao intermediário III que não sofreu a desproteção. A mancha com menor valor pode ser relativa ao intermediário IV desejado. Em adição, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.22) não apresentou sinais em 1,59 e 1,62 ppm, o que indica a hidrólise da lactona do ácido málico protegido. Ainda em relação a este último, observou-se sinal em 4,09 ppm, indicativo de hidrogênio da hidroxila liberada na hidrólise da proteção, e também, sinais próximos de 2,59 ppm, que caracterizam a presença do ácido málico. Além disso, no espectro são evidentes os sinais entre 7-8 ppm, indicativos dos hidrogênios da 3-hidroxiflavona. Dessa forma, provavelmente se obteve o intermediário IV por esse método, ainda que impuro.



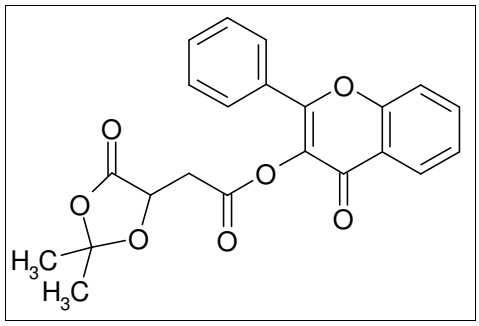


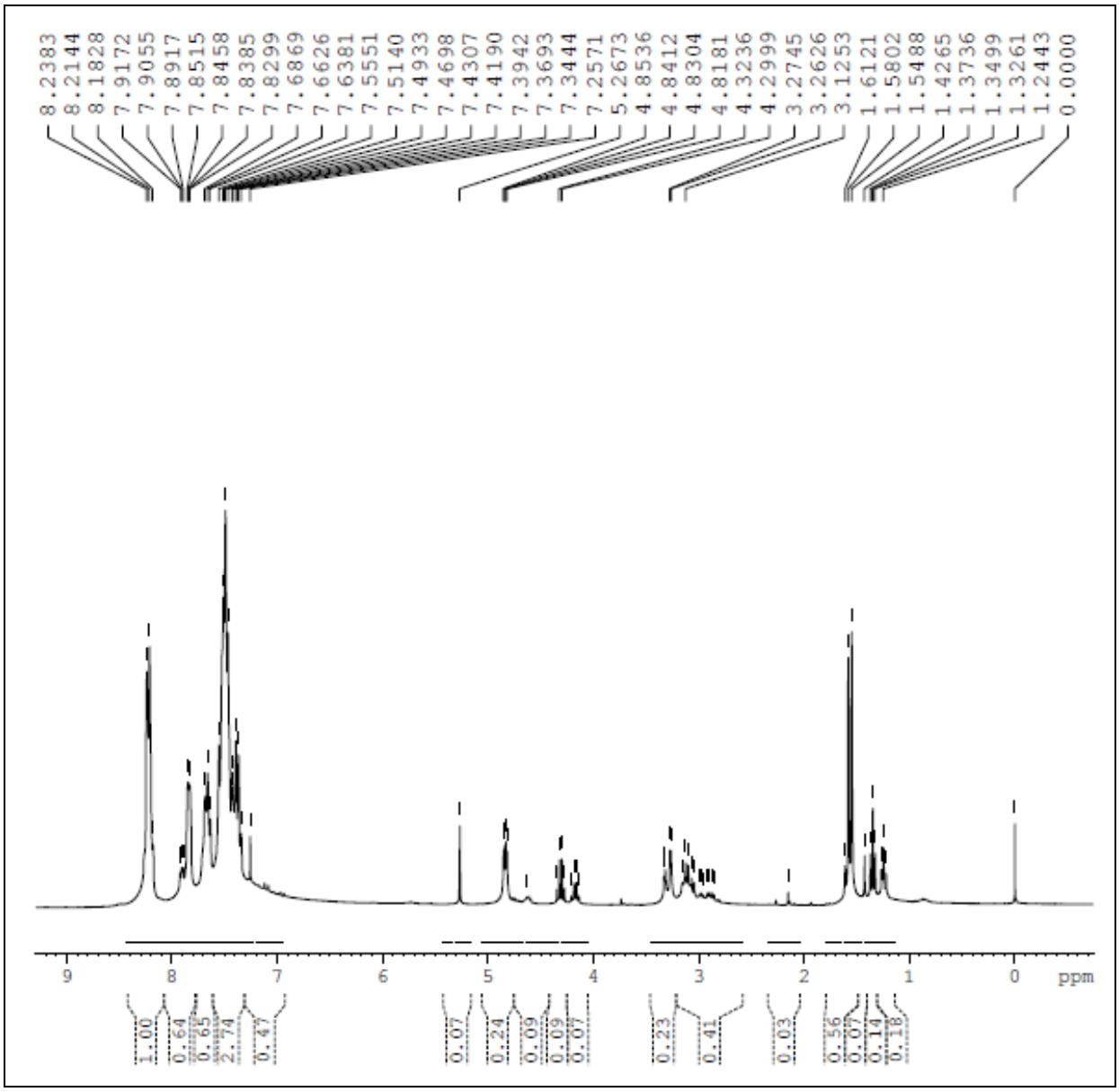
Espectro A.22: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre 3-hidroxiflavona e ácido málico, obtido após a hidrólise da lactona, com o método G.

A.4.1.3.2.5 Método H

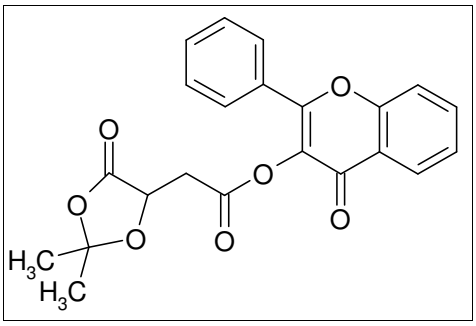
O método H consiste na utilização de ácido acético, tetraidrofurano e água para a hidrólise da lactona do intermediário III.

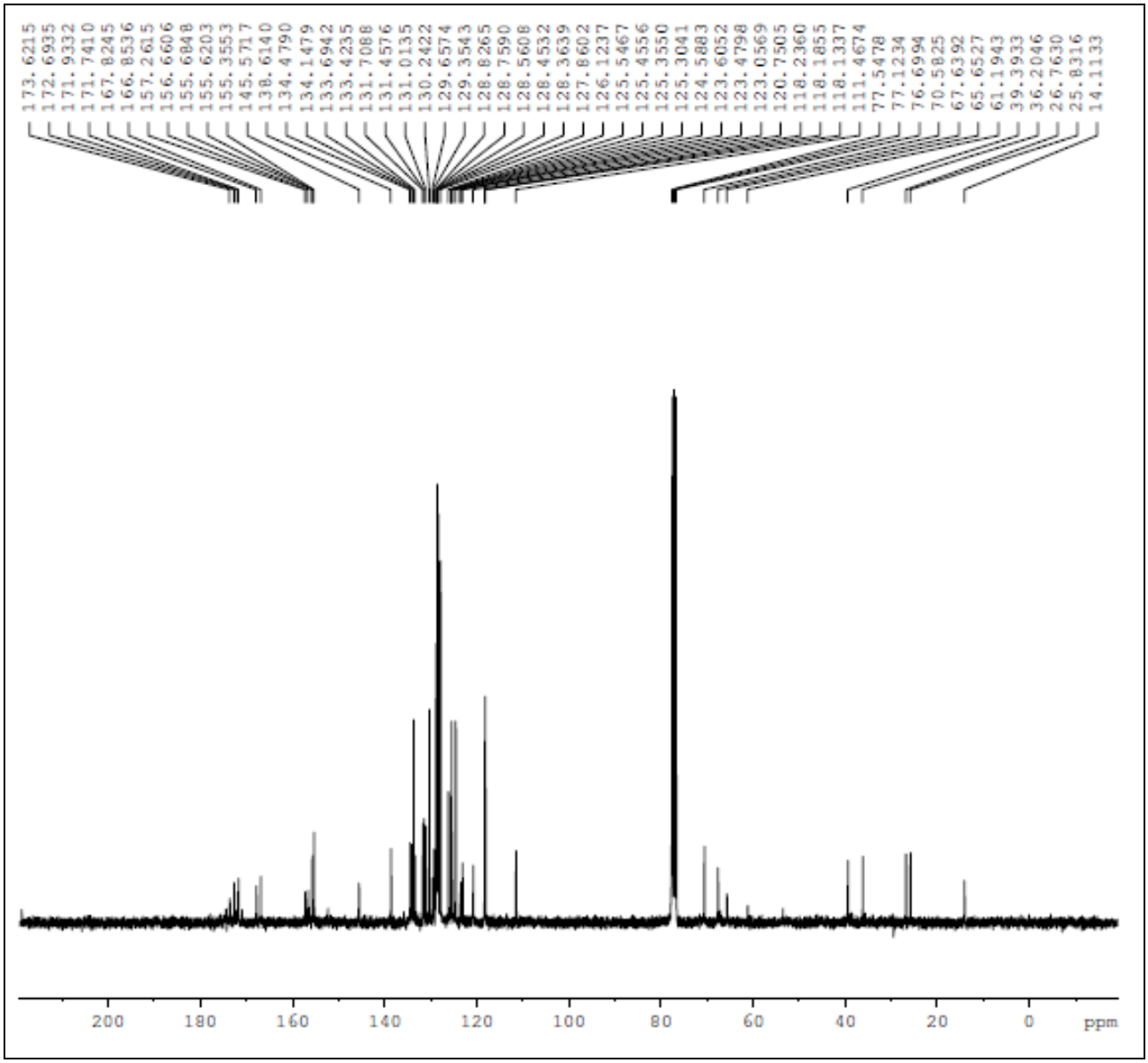
Para o experimento H1, após 6 horas de reação, a cromatografia em camada delgada mostrou a presença de duas manchas com R*f* iguais a 0,53 e 0,61. A mancha com R*f* de 0,61 está relacionada ao intermediário III que não sofreu a hidrólise da proteção do ácido málico protegido, já a outra mancha pode ser relativa ao composto desprotegido. Entretanto, o espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.23) mostra a presença dos sinais em 1,58 e 1,61 ppm, relacionados aos hidrogênios das metilas presentes no ácido málico protegido, o que indica não ter ocorrido a hidrólise da proteção do intermediário III. Portanto, com esta condição não foi obtido o intermediário desprotegido. O espectro de RMN ^{13}C (Espectro A.24) é outra evidência de que não ocorreu a desproteção do intermediário III, pois estão presentes os sinais em 25-26 e 36,20 ppm, relacionados, respectivamente, aos carbonos das metilas e ao carbono C_5 da lactona do ácido málico protegido.





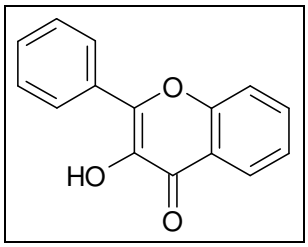
Espectro A.23: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre 3-hidroxiflavona e ácido málico, obtido após a hidrólise da lactona, com o experimento H1.

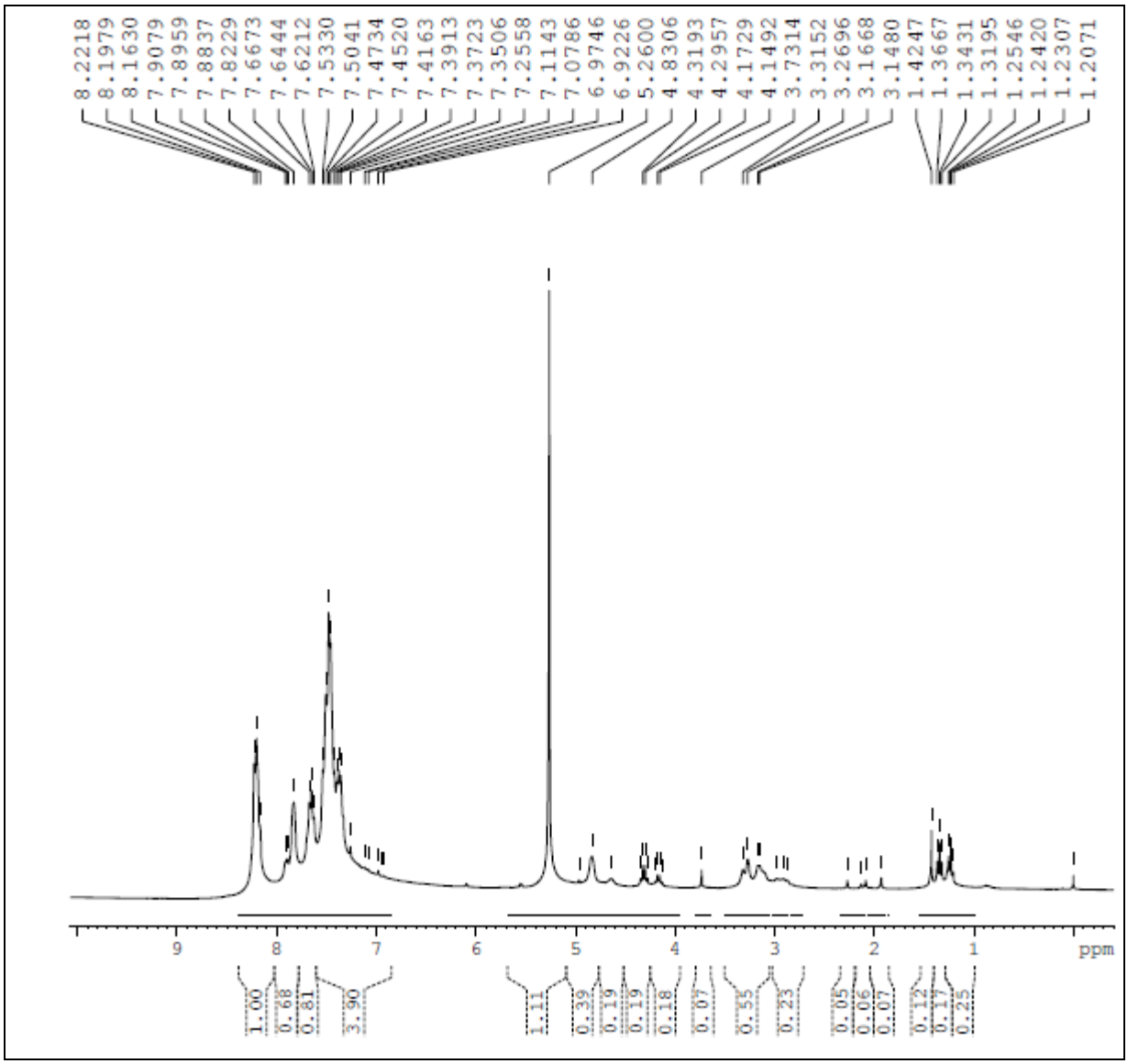




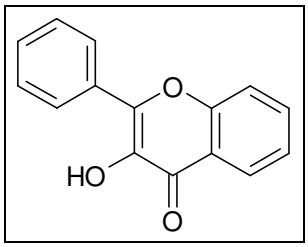
Espectro A.24: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre 3-hidroxiflavona e ácido málico, obtido após a hidrólise da lactona, com o experimento H1.

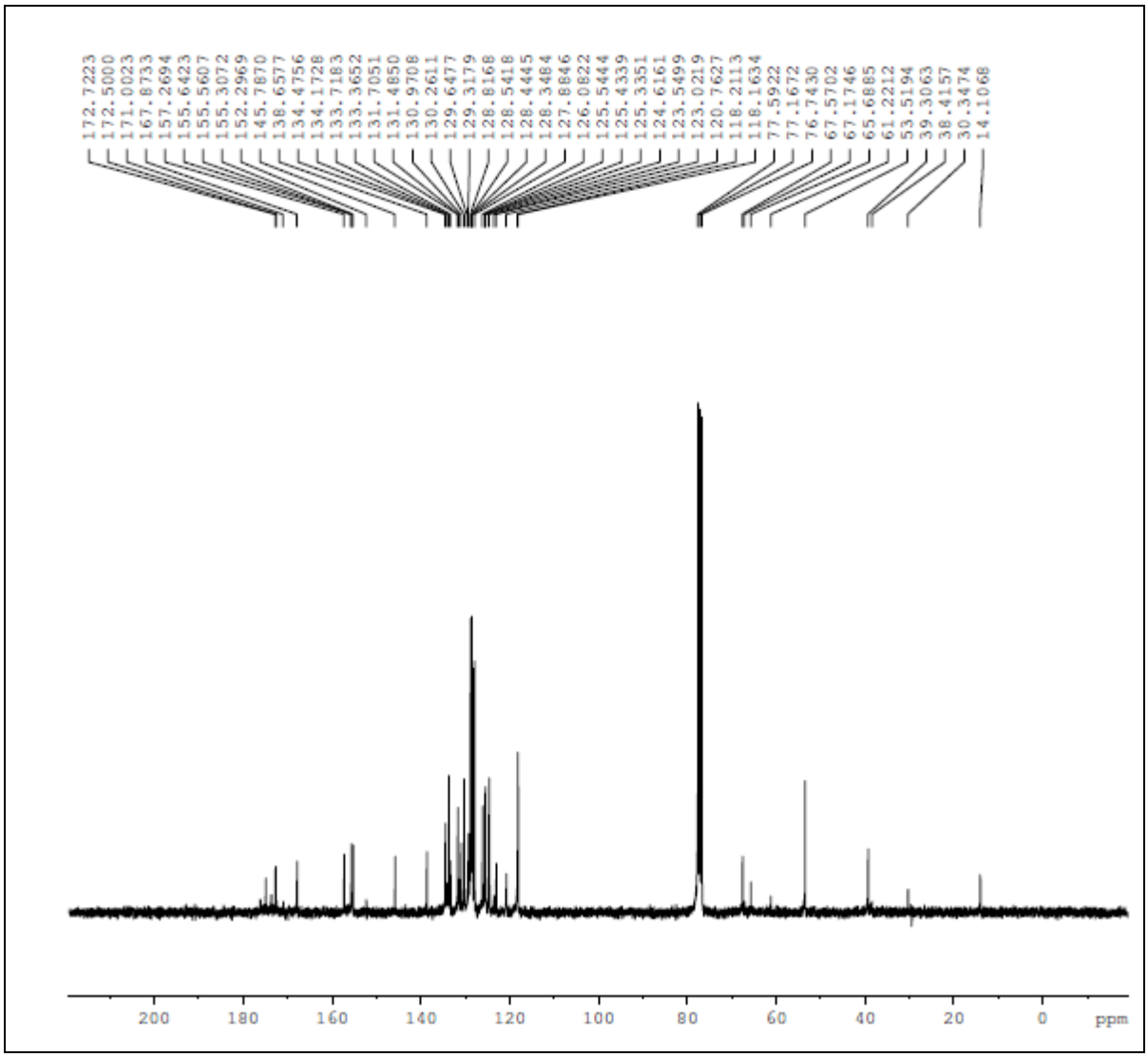
No experimento H2, após 6 horas de reação, a cromatografia em camada delgada mostrou duas manchas com R*f* iguais a 0,61 e 0,81. A mancha com R*f* de 0,61 está relacionada ao intermediário III que não sofreu a desproteção da lactona. A outra mancha tem R*f* igual a 0,81, mesmo valor apresentado pela 3-hidroxiflavona, o que indica a hidrólise do éster formado entre o álcool e o ácido carboxílico, da 3-hidroxiflavona e do ácido málico protegido, respectivamente. No espectro de RMN ^{1}H (Espectro A.25) estão evidentes os sinais da 3-hidroxiflavona na região de 7-8 ppm. No mesmo espectro, não se observam sinais em 1,59 e 1,62 ppm, o que indica a hidrólise da lactona do ácido málico protegido. Ainda com relação ao espaçante, observam-se sinais entre 3,14-3,31 ppm e 4,83 ppm, correspondentes aos hidrogênios dos carbonos 2 e 3 do ácido málico protegido. Entretanto, no espectro de RMN ^{13}C (Espectro A.18) aparecem sinais característicos da 3-hidroxiflavona na região de 118-157 ppm, porém ausência dos sinais dos carbonos C_2 e C_3 do ácido málico protegido na região de 70 e 110 ppm, o que indica a hidrólise da ligação éster. Portanto, com esta condição não foi obtido o intermediário IV desejado.





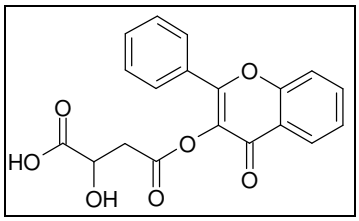
Espectro A.25: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre 3-hidroxiflavona e ácido málico, obtido após a hidrólise da lactona, com o experimento H2.

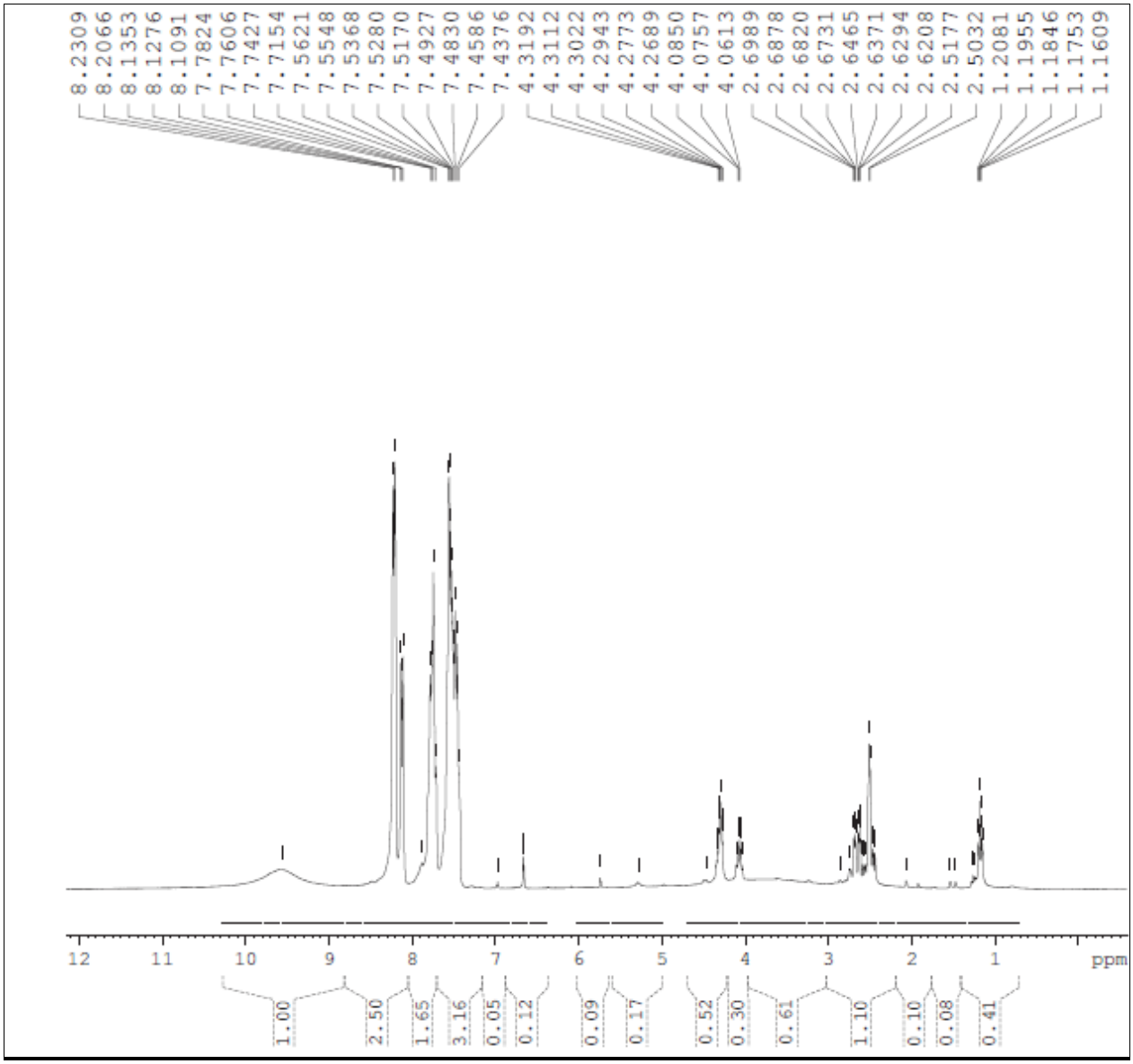




Espectro A.26: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre 3-hidroxiflavona e ácido málico, obtido após a hidrólise da lactona, com o experimento H2.

Para os experimentos H3 e H4, a cromatografia em camada delgada mostrou a formação de duas manchas com R*f* igual a 0,53 e 0,81, a última relacionada à presença de 3-hidroxiflavona, o que indica a hidrólise da função éster formada entre o ácido málico protegido e a 3-hidroxiflavona. A outra mancha pode ser indicativa de que o intermediário IV, produto da hidrólise da proteção do ácido málico protegido, foi obtido. No espectro de RMN ^{1}H observa-se o desaparecimento dos sinais entre 1,59 e 1,62 ppm, relativos às metilas do ácido málico protegido (Espectro A.27). Ainda em relação ao espaçante, o sinal em 4,06 ppm pode ser do hidrogênio da hidroxila, originada na desproteção dos grupos ácido e álcool. Em adição, outros sinais caracterizam a presença do ácido málico na região de 2,60 e 4,30 ppm. No mesmo espectro, são evidentes os sinais referentes à 3-hidroxiflavona na região entre 7-8 ppm. Os experimentos H3 e H4 apresentaram resultados semelhantes, indicativos de que se obteve o intermediário IV desejado, porém com muitas impurezas.





Espectro A.27: Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do produto impuro da reação entre 3-hidroxiflavona e ácido málico, obtido após a hidrólise da lactona, com o experimento H4.

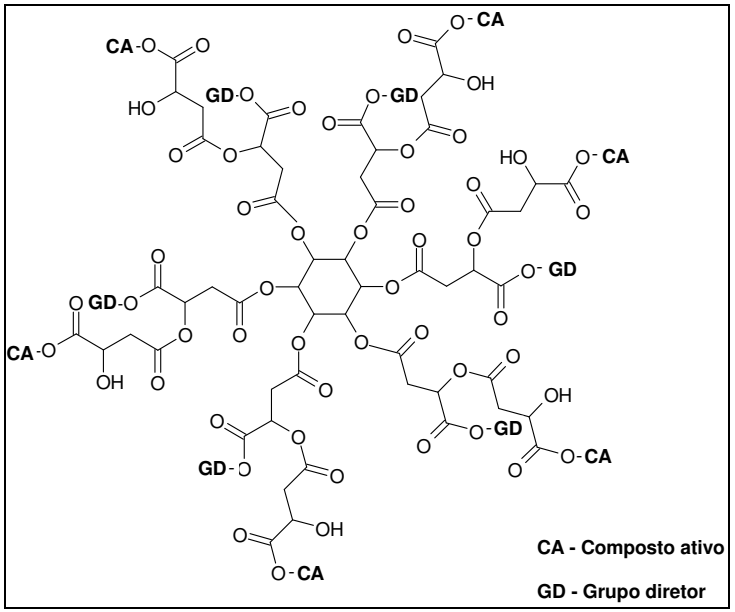
As maiores dificuldades encontradas na síntese desses intermediários foram, como o observado no projeto original, obter derivados puros e, no caso dos intermediários IV, deproteger o ácido málico sem hidrolisar a ligação com o derivado

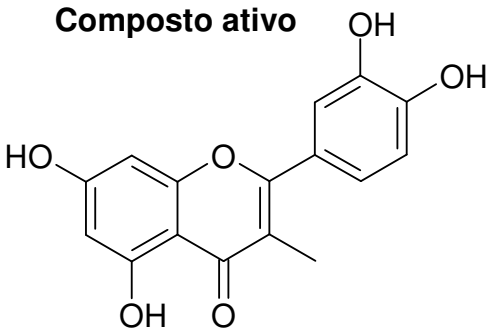
bioativo, no caso, a 3-hidroxiflavona. A busca por processos de purificação e de hidrólise mais específica é o desafio para as próximas etapas do trabalho.

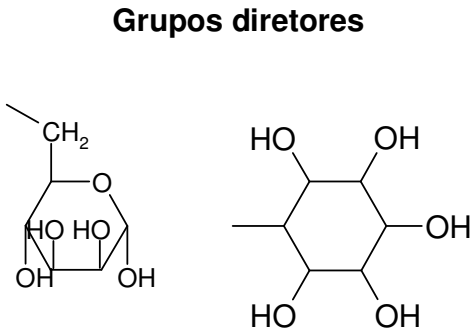
A.4.2 Modelagem molecular

A.4.2.1 *Estudo de liberação dos dendrímeros drigidos de quercetina*

Seguindo o trabalho realizado por Giarolla *et al.* (2010, 2012), utilizaram-se metodologias de modelagem molecular para melhor compreensão e previsão sobre a liberação dos dendrímeros dirigidos planejados com o flavonóide, quercetina. Com base no planejamento de dendrímeros com *mio*-inositol (foco central e grupo diretor), *D*-manose (grupo diretor), ácido L(-)-málico (agente espaçante e *dendron*) e quercetina (flavonóide com promissora atividade leishmanicida), construíram-se modelos contendo uma, duas e três ramificações com manose e inositol como grupos diretores (Figura A.15). É importante ressaltar que estas estruturas provavelmente serão liberadas por ação enzimática, mais especificamente, por esterases inespecíficas. Essas enzimas podem atuar em quatro pontos das ramificações: grupos carbonílicos presentes nos modelos dendriméricos planejados, denominando-se C_1 o grupo carbonílico próximo ao foco central inositol, C_2 a carbonila externa ligada ao grupo diretor (inositol e manose), C_3 o carbono carbonílico que liga o segundo ácido málico e C_4 a carbonila próxima ao composto bioativo quercetina (Figura A.16).







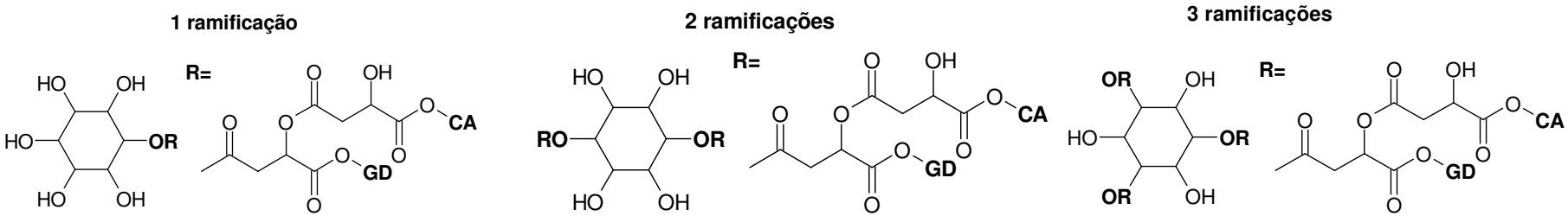


Figura A.15: Representação esquemática dos modelos estudados em modelagem molecular. GD-grupo diretor.

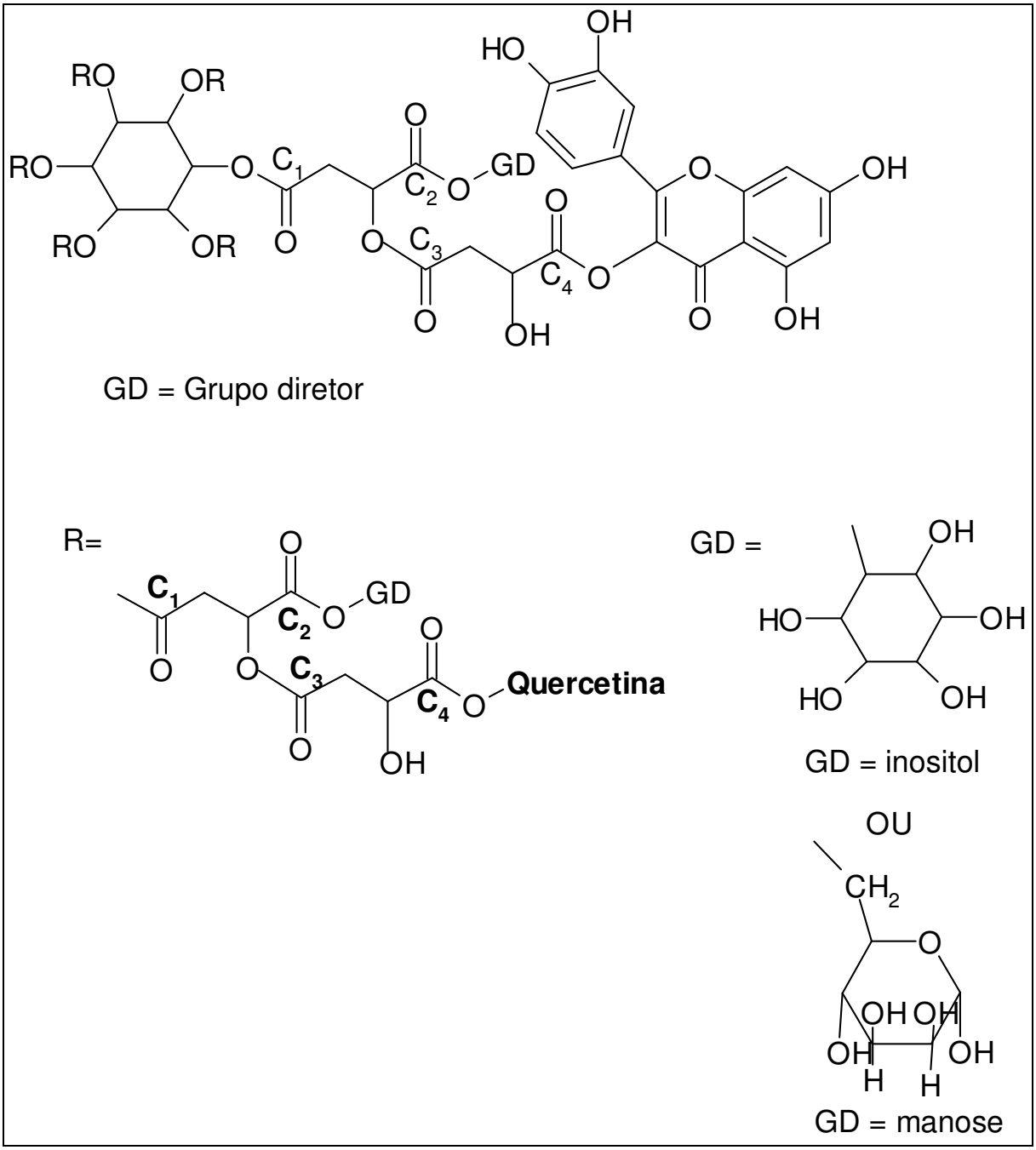


Figura A.16: Representação esquemática do dendrímero planejado, constituído por foco central *mio*-inositol, ácido L(-)-málico, grupo diretor (*mio*-inositol e *D*-manose) e composto bioativo quercetina. Em destaque os grupos carbonílicos suscetíveis à hidrólise enzimática. GD-Grupo Diretor.

A disposição espacial dos grupos carbonílicos foi analisada, aspecto importante para fornecer informações com relação ao comportamento estérico destes grupos para a aproximação e, consequentemente, clivagem enzimática. Em adição, estudou-se a densidade eletrônica nestas carbonilas, por meio das cargas de potencial eletrostático, característica relevante na análise da suscetibilidade destes carbonos ao ataque nucleofílico enzimático. As ligações de hidrogênio foram determinadas, interações importantes para estabilidade dos modelos planejados.

Os confôrmeros de menor energia mínima, obtidos das simulações de dinâmica molecular, foram avaliados quanto à integridade estrutural pelo desvio da raiz dos quadrados mínimos (*root means square deviation*-RMSD), por meio da sobreposição de suas estruturas. Para sistemas com grande número de átomos, a integridade estrutural é mantida quando o valor de RMSD é inferior a 1,5 Å (TOKARSKI, HOPFINGER, 1997). Com a utilização do *software Hyperchem* 7.51, observou-se que os modelos gerados mantiveram a integridade estrutural, pois todos apresentaram valor de RMSD inferior ao descrito na literatura que é de 1,5 Å.

Os valores de energia total (Etotal) correspondem à soma de todas as contribuições energéticas da estrutura e quanto menor este valor, mais energeticamente favorável é o sistema (Tabela A.V). Todos os modelos estudados foram energeticamente favoráveis, pois apresentaram valores de Etotal negativos.

O dendrímero dirigido de quercetina e *mio*-inositol com três ramificações foi o sistema que apresentou maior número de ligações de hidrogênio (11 interações) e, também, foi o mais estável com valor de Etotal equivalente a -654,22 kcal/mol. Os dendrímeros dirigidos de manose apresentaram aumento progressivo no número de ligações de hidrogênio, sendo 1, 5 e 8 ligações, respectivamente para os dendrímeros com uma, duas e três ramificações. Também, foi observado o mesmo comportamento para os dendrímeros dirigidos de inositol que tiveram aumento gradual no número de ligações de hidrogênio (3, 4 e 11 ligações de hidrogênio para os dendrímeros dirigidos com uma, duas e três ramificações).

Tabela A.V – Parâmetros dos dendrímeros com uma, duas e três ramificações constituídos por quercetina e grupos diretores (inositol e manose)

Dendrímero de quercetina	Etotal (kcal/mol)	RMSD (Å)	Número de ligações de hidrogênio
Uma ramificação			
mio-inositol	-152,04	0,93	3
D-manose	-77,17	0,18	1
Duas ramificações			
mio-inositol	-459,84	0,42	4
D-manose	-213,54	0,20	5
Três ramificações			
mio-inositol	-654,22	0,57	11
D-manose	-426,28	0,30	8

O impedimento estérico e a disposição espacial foram analisados pelos modelos CPK, para previsão dos pontos com maior disponibilidade para aproximação econsequente ataque enzimático. Para avaliação da densidade eletrônica utilizou-se o mapa de potencial eletrostático (MPE), para determinar os grupos carbonílicos mais eletrofílicos, com menor densidade eletrônica, portanto, os mais suscetíveis à clivagem por esterases inespecíficas.

No sistema com uma ramificação de quercetina e *mio*-inositol (Figura A.15), observou-se que o grupo carbonílico, denominado C_4 próximo à quercetina (composto bioativo), é o alvo mais promissor para sofrer ataque nucleofílico de esterases inespecíficas. Esta região apresentou maior disponibilidade espacial e, também, menor densidade eletrônica no mapa de potencial eletrostático (Figura A.17).

Entretanto, no dendrímero com um *dendron* de quercetina e grupo diretor *D*-manose (Figura A.15), a carbonila C_2, grupo carbonílico externo que está ligado ao grupo diretor manose apresentou menor impedimento estérico entre as carbonilas analisadas, como mostra o modelo CPK. As propriedades do MPE indicaram o mesmo

carbono carbonílico como o mais promissor ao ataque enzimático, pois esta região tem menor densidade eletrônica (Figura A.17).

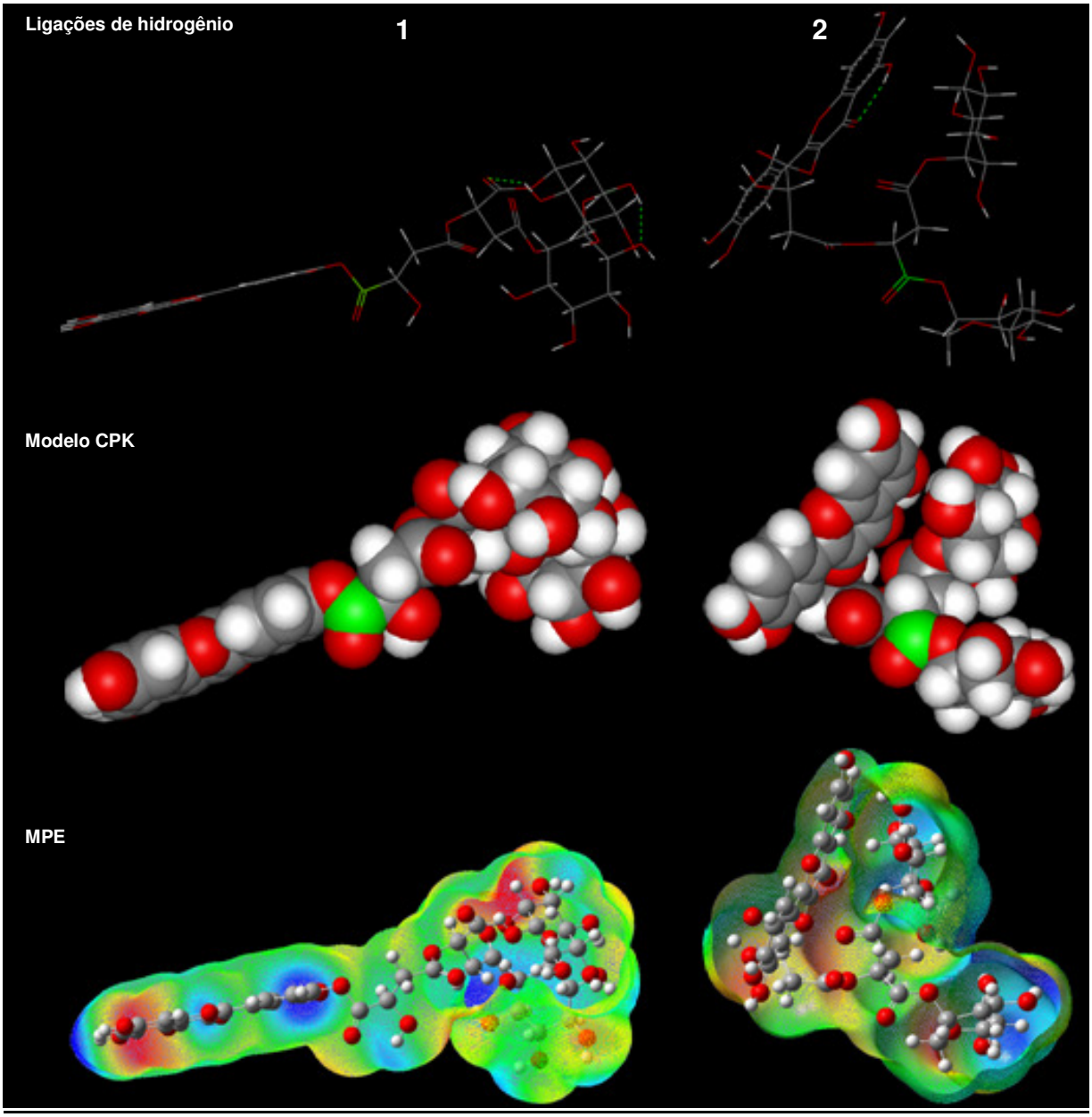


Figura A.17: Modelos 3D dos dendrímeros com uma ramificação de quercetina com *mio*-inositol (1) e quercetina com *D*-manose (2). As ligações de hidrogênio são representadas por linhas verdes pontilhadas, modelo CPK e MPE. A faixa de coloração do MPE foi de -7,5 (vermelho) a 7,5 (azul) e^{-2}. Esquema de cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), O (vermelho), nitrogênio (azul). As carbonilas com menor impedimento estérico estão destacadas em verde no modelo CPK.

Os modelos com dois *dendrons* de quercetina e *mio*-inositol e *D*-manose (Figura A.15) apresentaram como ponto mais vulnerável à hidrólise a carbonila C_2, que está diretamente ligada ao grupo diretor. Esta demonstrou maior probabilidade de sofrer ataque nucleofílico enzimático (cor azul/verde), pois é o grupamento que apresenta menor densidade eletrônica no MPE. Em adição, o modelo CPK mostrou estes carbonos carbonílicos como menos impedidos estericamente, quando comparados aos demais carbonos envolvidos no estudo (Figura A.18).

Nos dendrímeros com três ramificações, tanto de grupo diretor *mio*-inositol quanto de *D*-manose (Figura A.15), o grupo carbonílico que apresentou maior probabilidade de sofrer ataque nucleofílico foi a C_4, carbonila próxima ao composto bioativo quercetina. Avaliando o mapa de potencial eletrostástico, este grupamento apresentou maior deficiência em elétrons nesta região (cor azul/verde). Os dados de impedimento estérico corroboram esta previsão, pois o menor impedimento estérico foi observado nesta região, como demonstrado no modelo CPK (Figura A.19).

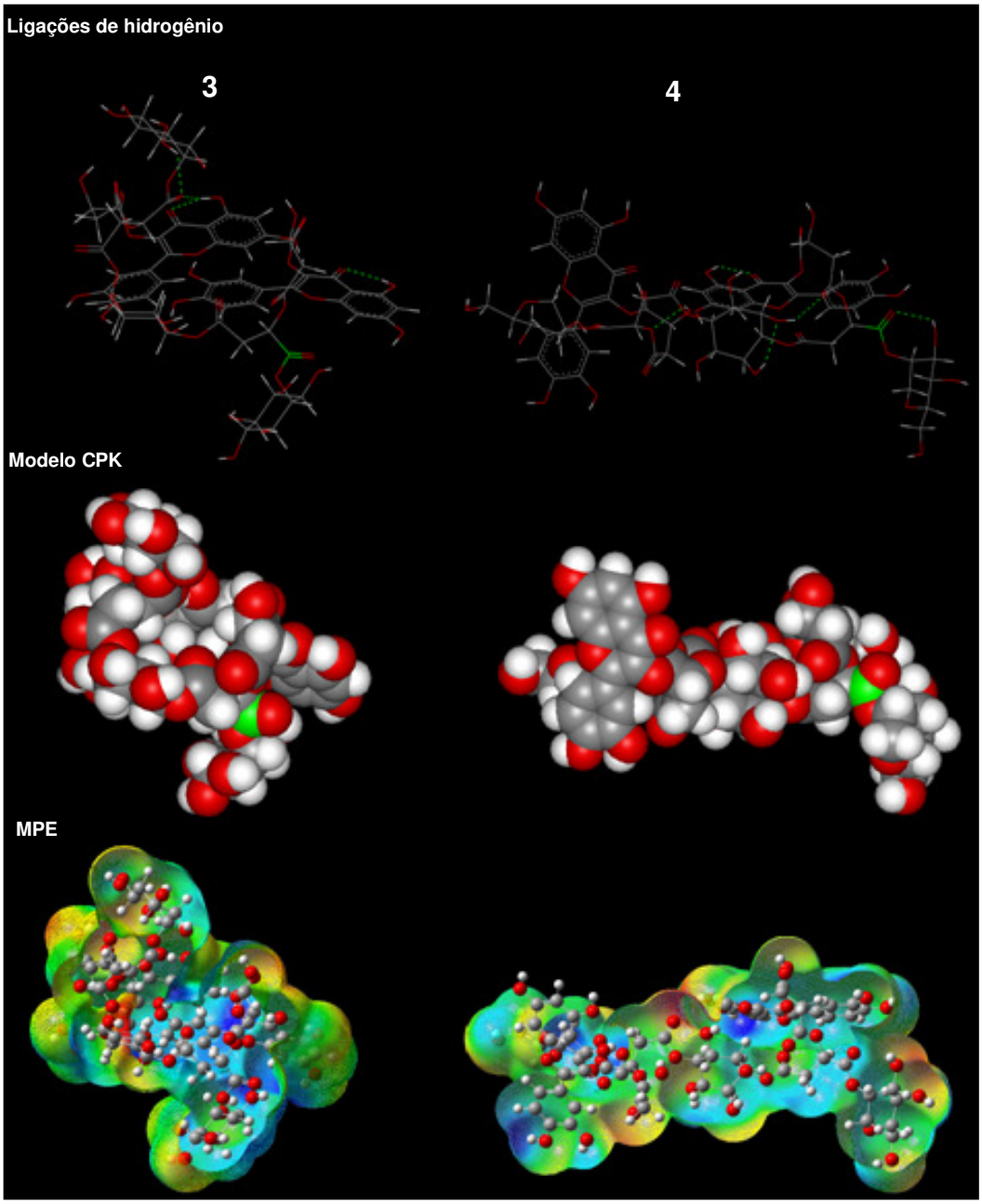


Figura A.18: Modelos 3D dos dendrímeros com duas ramificações de quercetina com *mio*-inositol (3) e quercetina com *D*-manose (4). As ligações de hidrogênio são representadas por linhas verdes pontilhadas, modelo CPK e MPE. A faixa de coloração do MPE foi de -7,5 (vermelho) a 7,5 (azul) e^{-2}. Esquema de cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), O (vermelho), nitrogênio (azul). As carbonilas com menor impedimento estérico estão destacadas em verde no modelo CPK.

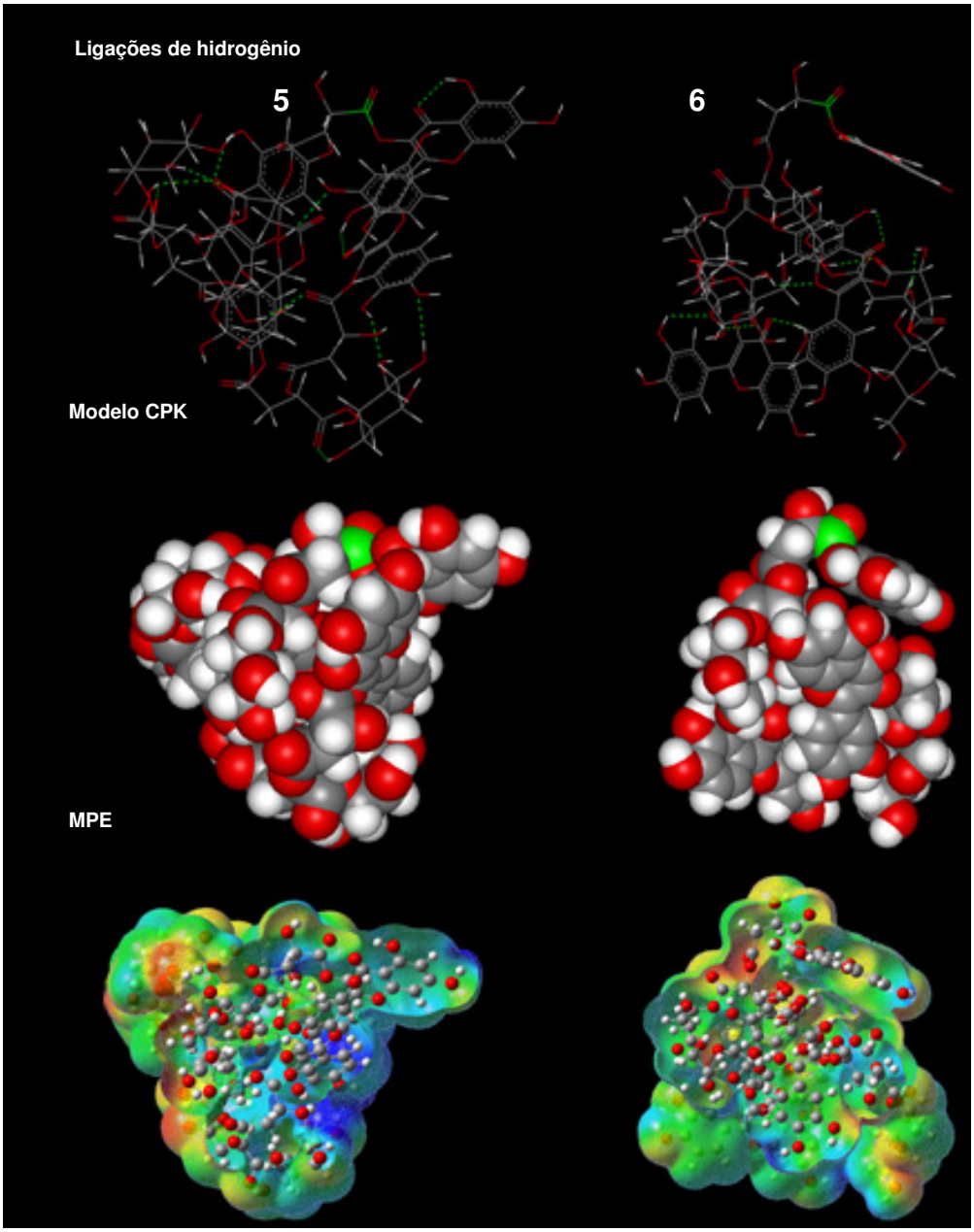


Figura A.19: Modelos 3D dos dendrímeros com três ramificações de quercetina com *mio*-inositol (5) e quercetina com *D*-manose (6). As ligações de hidrogênio são representadas por linhas verdes pontilhadas, modelo CPK e MPE. A faixa de coloração do MPE foi de -7,5 (vermelho) a 7,5 (azul) e^{-2}. Esquema de cores: carbono (cinza), hidrogênio (branco), O (vermelho), nitrogênio (azul). As carbonilas com menor impedimento estérico estão destacadas em verde no modelo CPK.

A modelagem molecular mostrou-se ferramenta útil na avaliação preliminar da liberação de fármacos dendriméricos dirigidos de quercetina potencialmente leishmanicidas em sistemas biológicos. No entanto, estudos experimentais de liberação devem ser realizados para validar os resultados computacionais, a fim de que se possam prever, teoricamente, os locais de liberação. Também, o estudo com a interação teórica com a enzima pode validar esses resultados preliminares e se constituir em ferramenta útil na previsão de mecanismo de liberação do composto bioativo da matriz dendrimérica.

A.5 CONCLUSÕES

Síntese dos dendrímeros com diferentes focos centrais pelo método divergente

- Os intermediários IA, IB e IC, respectivamente, derivados de etilenodiamina, de etilenoglicol e de glicerol, foram obtidos com EDC, embora impuros.
- Os métodos que utilizaram cloroformato de etila ou 4-nitrofenilcloroformato não levaram à obtenção dos compostos desejados e geraram o intermediário de síntese (anidrido misto entre o espaçante e o agente condensante);
- O método com DCC como agente condensante e etilenodiamina como foco central possivelmente gerou o intermediário de interesse, porém impuro.

Síntese do dendrímero dirigido de quercetina pelo método convergente

- A síntese do intermediário II (quercetina e ácido málico protegido), importante na obtenção dos dendrímeros, foi realizada com sucesso;

Síntese do dendrímero dirigido de 3-hidroxiflavona pelo método convergente

- A síntese e purificação do intermediário III (3-hidroxiflavona e ácido málico protegido), composto importante na obtenção dos dendrímeros, foram realizadas com êxito;

- De acordo com as análises espectroscópicas, a reação de desproteção com ácido acético, tetraidrofurano e água (Experimento H3) foi a melhor condição para a desproteção do intermediário III.

Estudo de liberação dos dendrímeros drigidos de quercetina

- A modelagem molecular auxiliou na compreensão do comportamento de liberação dos dendrímeros dirigidos de quercetina e, desta forma, possibilitou a previsão preliminar dos pontos mais vulneráveis à ação de esterases inespecíficas, com necessidade de validação teórica por outros métodos e, também, experimental.

A.6. PERSPECTIVAS

⇒ Aprimorar as técnicas de purificação para os compostos obtidos;

⇒ Dar continuidade aos estudos sintéticos para obtenção de dendrímeros com novos focos centrais;

⇒ Dar continuidade às reações para obtenção dos dendrímeros com novos focos centrais e obtenção dos dendrímeros dirigidos de 3-hidroxiflavona e de quercetina;

⇒ Prosseguir nos estudos de modelagem molecular visando à validação dos resultados obtidos. Estudos com o modelo cristalográfico de esterase;

⇒ Para os fármcos dirigidos dendriméricos a serem obtidos, proceder ao ensaio de liberação enzimática *in vitro*.

A.7 REFERÊNCIAS

ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, n.26, p.56-62, 2007.

BANVILLE, J.; BOUTHILLIER, G.; PLAMONDON, S.; REMILLARD, R.; MEANWELL, N. A.; ALAIN, M.; WALKER, M. A. Z)-2,2-Dimethyl-5-carboxymethylene-1,3-dioxolan-4-one: a new synthon for the synthesis of a,c-diketoacid derivatives. **Tetrahedron Letters**, v.51, p.3170-3173, 2010.

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.

DOHERTY, D. **MOLSIM**: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software - User's Guide, version 3.2, The Chem21 Group Inc.: Lake Forest, IL, 1997.

EMANUELE, A.D.; ATTWOOD, D. Dendrimer-drug interactions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.2147-2162, 2005.

GIAROLLA, J. **Pró-fármacos dendriméricos de hidroximetilnitrofural potencialmente antichagásicos.** Estudo de condições sintéticas para a primeira geração. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007, 155p [Dissertação de Mestrado].

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.; PASQUALOTO, K.F.M.; RANDO, D.G.; ZAIM, M.H.; FERREIRA, E.I. Molecular modeling study on the disassembly of dendrimers designed as potential antichagasic and antileishmanial prodrugs. **Journal of Molecular Modeling**, v.18, p.2257-2269, 2012.

JESUS, A.M.R. **Dendrímeros e suas aplicações.** Lisboa: Universidade de Nova Lisboa, 2003. Disponível em: <http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos2003%20PDF/Alexandre%20Jesus.pdf>. Acesso em: 12/10/2009 às 15h.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.3, p.18-22, 2000.

MANTELL, S.J. Amino acid derivatives. US Pat. nº 057767, 2007.

MORRISON, L.R. **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: Wiley, 1994. p.921-932.

PIETRO, A.D.; CONSEIL, G.; VICTORIA, J.M.P.; DAYAN, G.; CORTAY, H.B.; TROMPIER, D.; STEINFELS, E.; JAULT, J.M.; WET, H.; MAITREJEAN, M.; COMTE, G.; BOUMENDJEL, A.; MARIOTTE, A.M.; DUMONTET, C.; McINTOSH, D.B.; GOFFEAU, A.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; BARRON, D. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.59, p.307-322, 2002.

PILKA, E.S.; PHILIPS, C.; KING, O.N.F.; GUO, K.; DELFT, F.V.; PIKE, A.C.W.; ARROWSMITH, C.H.; WEIGELT, J.; EDWARDS, A.M.; OPPERMANN, U. Crystal structure of human β-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase in complex with quercetin. 2009. Disponível em: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3BPT>. Acesso em 25/01/2011 às 9h.

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

SEN, G.; MANDAL, S.; ROY, S.S.; MUKHOPADHYAY, S.; BISWAS, T. Therapeutic use of quercetin in the control ofinfection and anemia associated with visceral leishmaniasis. **Free Radical Biology & Medicines**, v.38, p.1257-1264, 2005.

SEN, G.; MUKHOPADHYAY, S.; RAY, M.; BISWAS, T. Quercetin interferes with iron metabolism in Leishmania donovani and targets ribonucleotide reductase to exertrol leishmanicidal activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, p.1066-1075, 2008.

SINGER, A.U.; SKARINA, T.; ONOPRIYENKO, O.; EDWARDS, A.M.; ANDERSON, W.F.; SAVCHENKO, A. Structure of IDP00107, a potential *N*-acetyl-gamma-glutamylphosphate reductase from Shigella flexneri. 2009. Disponível em: <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3DR3>. Acesso em 25/07/2010 às 9h.

SUNDARAMOORTHY, M.; GOLD, M.H.; POULOS, T.L. Ultrahigh resolution structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: implications for the catalytic mechanism. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.104, p.683-690, 2010.

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

TOKARSKI, J.S.; HOPFINGER, A.J. Constructing protein models for ligand-receptor binding thermodynamic simulations: an application to a set of peptidometic 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: starbust dendritic macromolecules. **Polymer Journal**, v.17, p.117-132, 1985.

VARGAS, F. **Síntese e aplicação de β-calcogeno amidas quirais em alquilações alílicas assimétricas.** Universidade de Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007, 188p [Tese de Doutorado].

ANEXO I

Instruções para banca examinadora

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

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

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

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

São Paulo, 26 de maio de 2011.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

ANEXO II

Atividades acadêmicas desenvolvidas

ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS

Resumo das atividades acadêmicas desenvolvidas:

PARTICIPAÇÃO EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

⇒ **V Escola de Modelagem Computacional em Sistemas Biológicos**, realizada no período de 23 a 27 de agosto de 2010, Petrópolis/RJ - Brasil;

⇒ **XLV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, realizada no período de 18 a 22 de outubro de 2010, São Paulo/SP - Brasil;

⇒ **5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry**, realizado no período de 06 a 09 de novembro de 2010, Ouro Preto/MG - Brasil;

⇒ **I Escola Brasileira de Modelagem Molecular**, realizada no período de 17 a 22 de janeiro de 2011, Santo André/SP – Brasil;

⇒ **International Seminar of Nanotechnology,** realizado no período de 4 a 5 de abril de 2011, São Paulo/SP – Brasil;

⇒ **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química,** realizada no período de 23 a 26 de maio de 2011, Florianópolis/SC – Brasil.

⇒ **II International Symposium on Drug Discovery,** realizado no período de 27 a 29 de julho de 2011, Araraquara/SP – Brasil.

⇒ **Sao Paulo School on Natural Products, Medicinal Chemistry and Organic Synthesis,** realizada no período de 14 a 18 de agosto de 2011, Campinas/SP – Brasil.

⇒ **XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica,** realizada no período de 17 a 21 de outubro de 2011, São Paulo/SP – Brasil.

⇒ **II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas,** realizado no período de 7 a 10 de novembro de 2011, São Paulo/SP – Brasil.

COMUNICAÇÕES EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

⇒ SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. **Molecular modeling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide**. Trabalho apresentado na forma de painel durante o *5th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry*, 2010.

⇒ SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. **Molecular modeling as a tool for studying a potentially leishmanicide targeted dendrimer**. Trabalho apresentado na forma de painel durante a *Australian Molecular Modeling Conference*: advances in biomolecular and materials modeling, 2010.

⇒ SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. **Molecular modeling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide**. Trabalho apresentado na forma de painel durante a *I Escola Brasileira de Modelagem Molecular*, 2011.

⇒ SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. **Molecular modeling as a tool for studying a potentially leishmanicide targeted dendrimer**. Trabalho apresentado na forma de painel durante o *International Seminar of Nanotechnology*, 2011.

⇒ SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. **Modelagem molecular na liberação de fármacos dendriméricos dirigidos de quercetina**. Trabalho apresentado na forma de painel durante a *34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2011.

⇒ SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. **Molecular modeling applied to the first generation of quercetin targeted dendrimer as drug delivery system**. Trabalho apresentado na forma de painel durante o *II International Symposium on Drug Discovery*, 2011.

⇒ SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. **Molecular modeling as a tool for studying a potentially leishmanicide targeted dendrimer**. Trabalho apresentado na forma de painel durante a *Sao Paulo School on Natural Products, Medicinal Chemistry and Organic Synthesis*, 2011.

⇒ SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. **Molecular modeling applied to the first generation of quercetin targeted dendrimer as drug delivery system**. Trabalho apresentado na forma de painel e **apresentação oral** durante a *XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica*, 2011.

⇒ SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. **Molecular modeling study of targeted dendrimer potentially leishmanicide**. Trabalho apresentado na forma de painel durante o *II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas*, 2011.

⇒ POLIDORO, A.; SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. **Estudo *in silico* de liberação de fármacos dendriméricos dirigidos de primeira geração de 3-hidroxiflavona**. Trabalho apresentado na forma de painel durante a *35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2012.

CURSOS

⇒ **"Dinâmica molecular básica".** Curso ministrado pelos professores Dr. Ernesto Caffarena (FIOCRUZ), Dr. Pedro Geraldo Pacutti (UFRJ), Dr. Gabriel Limaverde (INCA) e Dr. Samuel Pita (UFRJ), com carga horária de 6 horas, realizado durante a *V Escola de Modelagem Computacional em Sistemas Biológicos*, no período de 23 a 27 de agosto de 2010, Petrópolis/RJ - Brasil;

⇒ **"Predição de estruturas de proteínas: modelagem comparativa e *Ab initio*.** Curso ministrado pelos professores Priscila Capriles (LNCC) e Dr. Fábio Custódio (LNCC), com carga horária de 6 horas, realizado durante a *V Escola de Modelagem Computacional em Sistemas Biológicos*, no período de 23 a 27 de agosto de 2010, Petrópolis/RJ - Brasil;

⇒ **"Theoretical and numerical aspects related to the use of solvation continuum models".** Curso ministrado pela professora Dra. Benedetta Mennucci (Universitá di Pisa), com carga horária de 10 horas, realizado durante a *I Escola Brasileira de Modelagem Molecular,* no período de 17 a 22 de janeiro de 2011, Santo André/SP - Brasil;

⇒ **"Structure-based virtual ligand screening: methods and applications".** Curso ministrado pela professora Dra. Maria A. Miteva (Universidade de Paris), com carga horária de 10 horas, realizado durante a *I Escola Brasileira de Modelagem Molecular*, no período de 17 a 22 de janeiro de 2011, Santo André/SP – Brasil;

⇒ **"História da descoberta dos fármacos".** Curso ministrado pelo professor Carlos Alberto Mansour Fraga (Universidade Federal do Rio de Janeiro), com carga horária de 6 horas, realizado durante a *34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, no período de 23 a 26 de maio de 2011, Florianópolis/SC – Brasil.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

⇒ SANTOS, S. S.; POLLI, M. C. Participação em banca de Mariana Bertini Teixeira. **Avaliação do custo benefício do tratamento com pró-fármacos clássicos e recíprocos e seus precursores disponíveis no mercado farmacêutico brasileiro**, 2011. (Ciências Farmacêuticas) Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

⇒ SANTOS, S. S.; POLLI, M. C. Participação em banca de Bruna Taliani Tuan e Natalia Grasiela Mendes. **Fármacos aprovados pelo FDA no período de 2006 a junho de 2011**, 2011. (Ciências Farmacêuticas) Pontifícia Universidade Católica de Campinas.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTO

⇒ FERREIRA, E.I.; TROSSINI, G.; ANDRICOPULO, A. D.; VAZ, B. A.; SANTOS, S. S.; BRITO, C. L.; SILVA, F.; LEMES, J. P.; GIAROLLA, J.; PACHIONI, J.; ARRIBAS, M. A.; PRIMI, M. C.; SA, M. M.; SEGRETTI, N.; SERAFIM, R. A. M.; OTELO, V. A. **II Simpósio de Planejamento e Desenvolvimento de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas**, 2011. (Congresso, Organização de evento).

OUTRAS ATIVIDADES

⇒ **Estágio no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.** Disciplina: Química Farmacêutica I, supervisionado pela Profa. Dra. Veni Maria Felli, realizado no período de julho a dezembro de 2010.

ARTIGO SUBMETIDO

⇒ SANTOS, S.S.; GIAROLLA, J.; PASQUALOTO, K.F.M.; FERREIRA, E.I. **Molecular modeling as a tool for studying the disassembly of potentially leishmanicide targeted dendrimer**. Submetido à revista *Molecular Simulation* em 06/08/2012.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9138 - 6754829/1 - Soraya da Silva Santos

Email:	soraya.ssantos@usp.br
Data de Nascimento:	23/01/1986
Cédula de Identidade:	RG - 43.634.908-5 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Centro de Ciências da Saúde - Universidade Católica de Santos - São Paulo - Brasil - 2009

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula:	10/02/2010
Início da Contagem de Prazo:	10/02/2010
Data Limite:	10/08/2012
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 10/02/2010 até o presente. E.Mail: hajudan@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 06/05/2011
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Mestrado em 10/02/2010 Matrícula de Acompanhamento em 23/07/2012

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 23/07/2012
Impresso em: 06/08/12 16:03:01

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9138 - 6754829/1 - Soraya da Silva Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5777 - 2/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos	01/03/2010	13/06/2010	45	3	93,3	B	N	Concluída
FBF5704 - 5/3	Análise Espectrométrica de Fármacos	02/03/2010	14/06/2010	150	10	100	A	N	Concluída
EDM5102 - 1/2	Preparação Pedagógica PAE (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/05/2010	14/07/2010	90	6	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBF-0415 Química Farmacêutica I, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/07/2010	30/11/2010	-	3	0	-	-	-
FBF5766 - 2/3	Biodisponibilidade e Bioequivalência de Medicamentos	05/08/2010	06/10/2010	90	6	87,5	A	N	Concluída
FBF5785 - 2/1	Tópicos Avançados de Fármaco e Medicamentos (Princípios do Planejamento e Descoberta de Fármacos com Atividade Anticâncer	16/11/2010	22/11/2010	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5803 - 1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Técnicas Computacionais no Estudo da Dinâmica do Reconhecimento Fármaco-receptor)	26/09/2011	02/10/2011	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBF5808 - 1/1	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos (Drug Design: Basis for the Design of Antineoplasic Candidates)	11/06/2012	17/06/2012	30	0	0	-	N	Pré - matrícula indeferida
FBF5808 - 1/2	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos (Drug Design: Basis for the Design of Antineoplasic Candidates)	02/07/2012	08/07/2012	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	32
Estágios:			
Total:	0	25	32

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 03/08/2011.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 23/07/2012

Impresso em: 06/08/12 16:03:01

Artigo submetido para

Molecular Simulation

Molecular modeling as a tool for studying the disassembly of potentially leishmanicide targeted dendrimer

Soraya da Silva Santos[1]*, Jeanine Giarolla[1], Kerly F. M. Pasqualoto[2], Elizabeth I. Ferreira[1]

[1] *LAPEN, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo (USP), SP, Brazil*

[2] *Laboratory of Biochemistry and Biophysics, Butantan Institute, Sao Paulo, SP, Brazil*

*Corresponding Author:
Soraya da Silva Santos
LAPEN, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo (USP), SP, Brazil
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária, São Paulo, SP – Brazil, 05508-900,
Phone/Fax:+ 55 13 3469 2980, 55 11 30913793
Email: soraya.ssantos@usp.br

Molecular modeling as a tool for studying the disassembly of potentially leishmanicide targeted dendrimer

Abstract

Molecular modeling studies were carried out to analyze which carbonyl group is the most vulnerable to disassembly of potentially leishmanicide targeted dendrimer. The dendrimers were designed with *myo*-inositol (core and directing group), *D*-mannose (directing group), L-malic acid (spacer and dendron) and hydroxymethylnitrofurazone (NFOH) as bioactive agent. The molecular models were built up containing single, two and three branches. For this preliminary analysis, physicochemical properties as electronic density distribution and steric hindrance regarding the carbonyl groups were evaluated, and the carbon atoms in the following carbonyl groups were considered: near the core (C_1), close to the directing group (C_2), in L-malic acid (C_3), and near the bioactive agent (C_4). The most probably targeted dendrimers showed the carbonyl close to the core as the most vulnerable region to suffer an enzymatic attack, except those molecular systems containing two branches with *D*-mannose as directing group, which showed the carbonyl group near NFOH as the most likely ester breaking point.

Keywords: Molecular modeling; leishmaniasis; targeted dendrimer; dendrimer disassembly

1. Introduction

Leishmaniasis is considered a superneglected tropical disease and affects primarily areas of extreme poverty. It represents an emergent illness with high morbidity and mortality. The etiological agents are intracellular macrophages parasites of the genus *Leishmania*. The protozoan is transmitted to humans by bite of the female phlebotomine sandflies. About 20 different species of the *Leishmania* spp. have been identified as pathogenic [1,2,3,4]. Basically, there are three main clinical manifestations: cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis (the most severe form) [5]. The disease is endemic in 88 countries on five continents with 350 million people at risk, 12 million infected and 200.000 deaths recorded per year [6].

The chemotherapy is scarce, limited, and expensive. The drugs available can cause undesirable side effects and there are already reports of drug resistance. Considering that, the discovery and development of new leishmanicide agents is currently necessary. Drug selectivity must be always covered in the designing and development of novel potential agents. For leishmanicide drugs, the selectivity can be achieved by the knowledge of biochemical targets in the parasite [7,8].

The hydroxymethylnitrofurazone (NFOH), a hydroxymethyl derivative of nitrofurazone synthesized by our research group, has shown to be primarily active against *Trypanosoma cruzi* and less toxicity than others trypanomicide agents [8,9]. This compound also showed *in vitro* activity against *Leishmania sp* [10]. In murine model, this derivative was four times less toxic than its prototype. In *T. cruzi*, NFOH maintained the parasitemia at undetectable levels, as observed for benznidazole drug.

Prodrug design or latentiation is a molecular modification process, which has been used as a quite promising method for developing new drugs (incremental innovation). This methodology can improve pharmaceutical, pharmacokinetic and pharmacodynamic drug properties. Prodrugs are derivatives chemically and pharmacologically inactive, which require enzymatic and/or chemical action to be converted, *in vivo,* to the lead compound. Furthermore, targeted drug is a latent form in which the carrier contains directing groups for the action site [11,12,13,14]. In this context, dendrimers have been used as excellent drug carrier candidates. The molecules can be loaded into the dendrimers as well as attached to this macromolecule [15,16,17]. The patent claimed by Ferreira and Giarolla (2007) [18] reports dendrimer prodrugs in which the branches are built up with drugs. This approach provides an exponential increase of drug in each generation of dendrimer.

The aim of this study was to apply molecular modeling methods to obtain computational information regarding disassembly of the first generation of leishmanicide targeted dendrimer. The dendrimers were designed with *myo*-inositol (core and directing group), *D*-mannose (directing group), malic L-acid (spacer and branch) and NFOH (bioactive agent) [19,20]. *D*-mannose, as dendrimer external groups, can provide a selective action to macrophages, since these cells contain mannose receptors on their surface. Moreover, *myo*-inositol is a quite important molecule involved in the biosynthesis of parasite membrane, which may lead to a selective protozoa action [21,22]. Four carbonyl groups of the targeted dendrimers were evaluated, regarding the molecular systems designed with one to three branches (Figure 1).

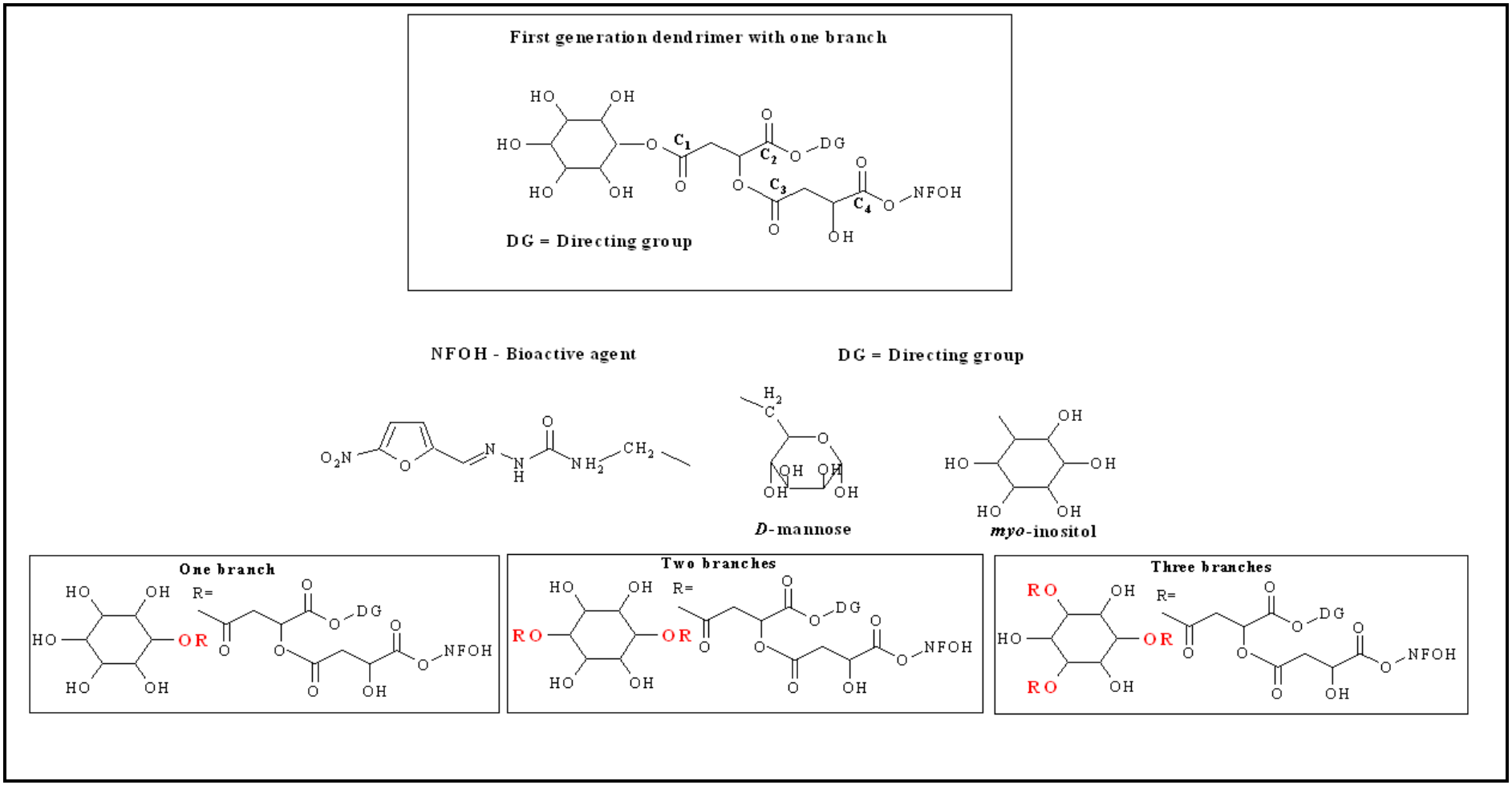


Figure 1. Schematic representation of the targeted dendrimer designed with *myo*-inositol (core), L-malic acid (spacer and branch), *D*-mannose or *myo*-inositol (external directing group) and the bioactive antiprotozoal agent (NFOH). The schemes of the molecular systems containing one, two and three branches are also represented.

2. Computational details

The computational methodologies were carried out as previously reported by Giarolla and coworkers [19,20]. Briefly, the three-dimensional (3D) molecular models of each dendrimer containing one, two and three branches with NFOH (bioactive agent) and directing groups (*myo*-inositol or *D*-mannose) in their neutral forms were built up, without any constrains, in MM+ force field [23] using the HyperChem 7.51 software [24]. The following crystallized structures were retrieved from the Brookhaven Protein Data Bank (PDB) [25] and employed as geometry references for building up the 3D molecular models: *myo*-inositol (3HO6, resolution 1.60 Å) [26], *D*-mannose (3M8M, resolution 1.45 Å) [27] and L-malic acid (3OG9, resolution 1.05 Å) [28]. The Cartesian coordinates retrieved from a cif file [29] were considered to construct the molecular model of bioactive agent (NFOH). Partial atomic charges were calculated employing the AM1 semiempirical method [30].

Energy-minimization of each molecular model was carried out employing steepest descent and, subsequently, conjugate gradients method, using MOLSIM 3.2 [31] software. The convergence criterion was 0.01 kcal/mol. The energy-minimized molecular models were used as input to perform molecular dynamics (MD) simulations [2 ns; step size 1 fs; 300 K]. A trajectory file was recorded every 20 steps resulting 100,000 conformations for each model. The dielectric constant of 3.5 was used to simulate the biological system environment [32]. In addition, the solvation and hydrogen bonding energy contributions were calculated only for the lowest-energy conformers selected from the equilibrium region of the conformational ensemble profile (CEF). The electrostatic potential charges using a grid-based method (ChelpG) [33] were calculated using *ab initio* method HF/3-21G* (Gaussian G03) [34]. The electrostatic potential (EP) was mapped onto a Connolly surface [35], using a color scheme ranged from -0.085 (intense red) to 0.085 (intense blue). Negative values of EP (higher electronic density distribution) are depicted in red color while positive values are in blue (lower electronic density distribution). The ViewerLite 4.2 software [36] was used for determining the number of hydrogen bonds and solvent-accessible surface area [37] of each targeted dendrimers.

3. Results and discussion

In this study, four carbonyl groups were evaluated based upon their place in the molecular system and the corresponding carbon atoms were called as follows: C_1 is the carbonyl carbon close to the *myo*-inositol core; C_2 is near the external directing group (*myo*-inositol or *D*-mannose), C_3 is the carbonyl carbon of L-malic acid, and C_4 is close to the bioactive agent (NFOH). Probably, these regions are involved in the disassembly of the designed dendrimer models. Physicochemical properties, such as spatial hindrance and electrostatic potential mapping, were evaluated to suggest which region would be more available to an enzymatic action. The steric hindrance in the four carbonyl groups, for instance, can be displayed through the solvent-accessible surface area as well as CPK (Corey-Pauling-Koltun) or space-filling model, whereas the electronic density distribution can be calculate onto the map of electrostatic potential (MEP). In this regard, the carbonyl group with smaller steric hindrance and lower electronic density distribution would be more susceptible to an enzymatic approach.

Table 1 presents the total potential energy (E_{total}), the root mean square deviation values (RMSD) between the energy-minimized input and the lowest-energy conformer from MD simulations, and the number of hydrogen bonds in NFOH targeted dendrimers containing one, two and three branches with *myo*-inositol or *D*-mannose as directing group. RMSD values indicate the maintenance of structural integrity [25]. Since the investigated molecular systems have a large number of atoms, RMSD values ≤ 1.5 Å [32] were considered to indicate the maintenance of structural integrity. All dendrimer models presented RMSD values lower than 1.5 Å (see Table 1).

The E_{total} values of each selected conformer correspond to the sum of the following intramolecular energy contributions: stretching, bending, torsional, Lennard-Jones or 1-4 type, electrostatic, van der Waals, solvation and hydrogen bonds [32]. In general, as more negative is the E_{total} value, more energetically favorable is the molecular model. The presence of a large number of intramolecular hydrogen bonds (Hb) in this set possibly contributed to the stability and conformational arrangement of those molecular models.

The targeted dendrimers with *myo*-inositol (parasite) or *D*-mannose (macrophage) as directing group had negative values of E_{total} (see Table 1). The most energetically favorable systems were the molecular models presenting three branches with *myo*-inositol and *D*-mannose as directing group (E_{total} equal to -453.25 and -422.17 kcal/mol, respectively). Furthermore, the molecular model with *myo*-inositol as directing group

showed the largest number of intramolecular hydrogen bonds (9), whereas that containing *D*-mannose presented six intramolecular hydrogen bonds. The molecular system with the highest E_{total} value (–38.45 kcal/mol) was composed by only one branch and *D*-mannose as directing group. This targeted dendrimer presented three intramolecular hydrogen bonds. The molecular systems containing just one branch showed higher E_{total} values probably due to higher freedom degrees.

It is noteworthy the relationship between the number of intramolecular hydrogen bonds and E_{total} values. As the number of intramolecular hydrogen bonds increases more energetically favorable (more negative E_{total} values) is the molecular system (Table 1).

Table 1. E_{total}, RMSD values and number of Hb found for the dendrimers designed with one, two and three branches containing NFOH as bioactive agent and directing groups (*myo*-inositol or *D*-mannose).

Directing group	Number of branches	E_{total} (kcal/mol)	RMSD (Å)	Number of Hb
	1	-149.62	0.32	-
Myo-inositol	2	-360.66	0.59	4
	3	-453.25	0.29	9
D-mannose	1	-38.45	0.70	3
	2	-278.42	0.21	4
	3	-422.17	0.09	6

The dendrimer models designed with one branch and targeted to (1) parasite (*myo*-inositol as direct group) and (2) macrophage (*D*-mannose as direct group) are presented in the fig. 2. The molecular model with *myo*-inositol (1) did not present intramolecular hydrogen bonding interactions. A smaller steric hindrance was observed in the carbonyl group near the *myo*-inositol core (C_1) in the CPK or space filling model. Moreover, in the same region, the largest solvent-accessible surface area was observed. MEP presented lower electronic density distribution, which can be visualized by the green/blue (neutral/positive) color on the carbonyl moiety next to *myo*-inositol core (C_1). Thus, considering the spatial hindrance and electronic distribution, the findings suggested that the ester breaking point probably would occur on the C_1.

The molecular model with one branch and *D*-mannose (2) as directing group presented three intramolecular hydrogen bonds (1.87, 1.96 and 2.24 Å) (see Fig. 2), being one of them established between *myo*-inositol (core) and its neighbor carbonyl group (1.96 Å). This kind of intramolecular interaction, as already mentioned, is

responsible for the conformational arrangement of the molecular system. Regarding the CPK or space filling model, the carbonyl group close to the core (C_1) showed more spatial availability. Additionally, this group presented higher solvent-accessible surface area. The same carbonyl group showed a neutral/positive (green/blue color) electronic density distribution, which would be an attractive region for a nucleophile enzymatic attack and, subsequent, dendrimer disassembly. Therefore, these findings indicated the region near *myo*-inositol core, carbonyl C_1, as the most suitable to suffer an enzymatic attack.

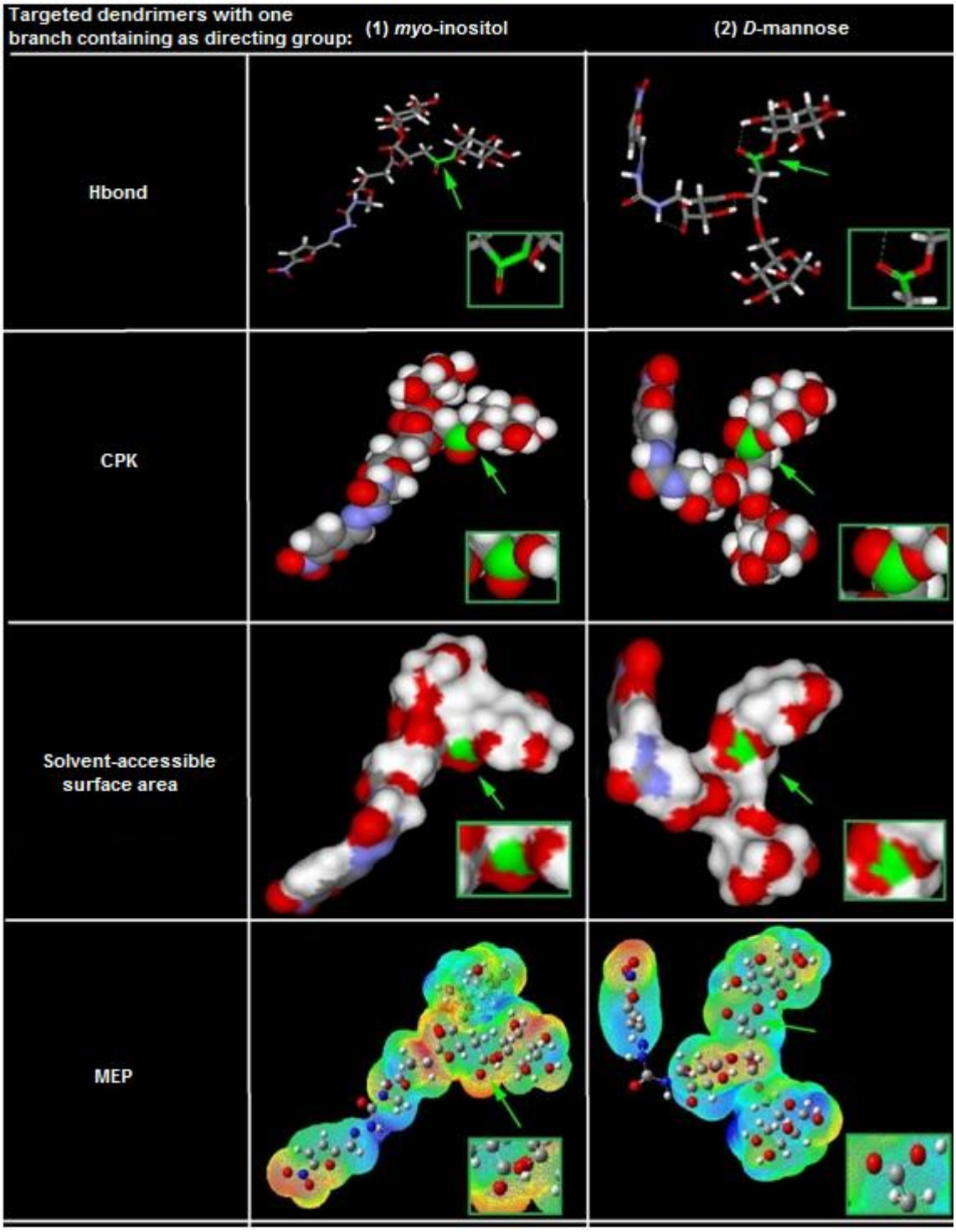


Figure 2. The lowest-energy conformation selected for the targeted dendrimers with one branch containing (1) *myo*-inositol and (2) *D*-mannose as directing group from MD simulation. The dendrimers are represented as stick models and the intramolecular hydrogen bonds as green dashed lines, CPK or space filling models and solvent-accessible molecular surfaces. Carbonyl groups with smaller steric hindrance are highlighted in green in CPK or space filling models and in solvent-accessible surfaces (ViewerLite 4.2). MEPs are represented using a color range from –0.085 (intense red) to 0.085 (intense blue) (GaussView 3.0). Color scheme: carbon atoms are in gray, nitrogen in blue, hydrogen in white and oxygen atoms are in red.

Figure 3 shows the targeted dendrimers with two branches containing (3) *myo*-inositol and (4) *D*-mannose as directing groups. The lowest-energy conformation selected from MD simulations for the dendrimer designed with *myo*-inositol as directing group showed four intramolecular hydrogen bonds (2.29, 2.35, 2.36 and 2.37 Å). The solvent-accessible surface area and space filling model displayed the C_1 carbonyl group as the most promising to suffer an enzymatic action, since it presented the largest available area. Additionally, this carbonyl group showed lower electronic density distribution (green/blue color; neutral/positive region), which is needed to a nucleophile attack. Considering all investigated properties put together, the region closer to the core (*myo*-inositol) is probably the most favorable to suffer an enzymatic action.

The two branches dendrimer model containing *D*-mannose (4) (Fig. 3) presented four intramolecular hydrogen bonds (1.91, 2.10, 2.28, 2.92 Å). These intramolecular interactions are indeed responsible for the conformation arrangement of the system. The CPK or space filling model and solvent-accessible surface suggested the carbonyl group near the bioactive agent NFOH (C_4) as the most promising to suffer an enzymatic attack. This region showed a smaller steric hindrance. MEP property showed the same carbonyl group as a promising target to a nucleophilic attack due to the lower electronic density distribution (green/blue color) on that portion. Taking all results into account, the carbonyl group near to the bioactive agent (C_4) is more suitable to an enzymatic action.

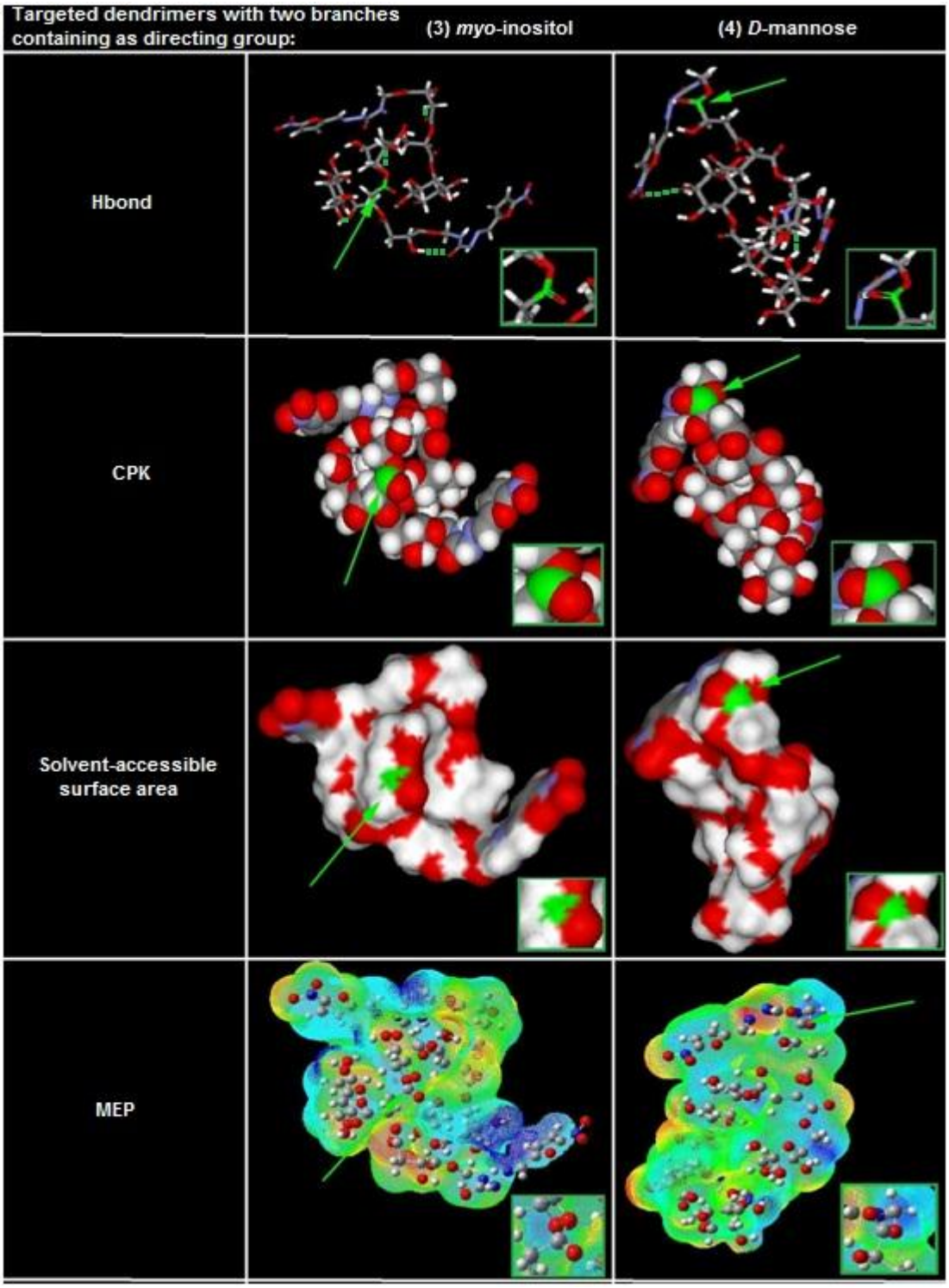


Figure 3. The lowest-energy conformation selected for the targeted dendrimers with two branches containing (3) *myo*-inositol and (4) *D*-mannose as directing group from MD simulation. The dendrimers are represented as stick models and the intramolecular hydrogen bonds as green dashed lines, CPK or space filling models and solvent-accessible molecular surfaces. Carbonyl groups with smaller steric hindrance are highlighted in green in CPK or space filling models and in solvent-accessible surfaces (ViewerLite 4.2). MEPs are represented using a color range from –0.085 (intense red) to 0.085 (intense blue) (GaussView 3.0). Color scheme: carbon atoms are in gray, nitrogen in blue, hydrogen in white and oxygen atoms are in red.

The NFOH targeted dendrimers constructed with three branches containing (5) *myo*-inositol and (6) *D*-mannose as directing groups are presented in fig. 4. The molecular model containing *myo*-inositol (5) showed nine intramolecular hydrogen bonds (1.94, 2.17, 2.18, 2.25, 2.26, 2.30, 2.32, 2.39, 2.73 Å). The solvent-accessible surface and CPK model revealed the carbonyl group close to the *myo*-inositol core (C_1) as the most spatially available region, allowing an enzymatic approximation, which is necessary to the dendrimer disassembly. Also, regarding the MEP property, this region displayed neutral/positive (green/blue color) electronic density distribution closer to the *myo*-inositol. Thus, the findings suggested the C_1 moiety as the most likely region for the breaking point.

The lowest-energy conformation selected from MD simulations for the three branches containing *D*-mannose (6) (Fig. 4) showed the carbonyl group close to the *myo*-inositol (core) (C_1) as the most suitable to an enzymatic nucleophile attack. This dendrimer model presented six intramolecular hydrogen bonds (1.86, 1.94, 2.00, 2.02, 2.24, 2.39 Å). The solvent-accessible surface and CPK or space filling model revealed a smaller steric hindrance in the C_1 region, which would allow the action of hydrolytic enzymes. Additionally, the same group presented a lower electronic density distribution (green/blue; neutral/positive) observing the color MEP. So, the C_1 carbonyl group is probably more suitable to suffer a nucleophile attack and, then, release the active compound (NFOH) from the dendrimers with three branches containing D-mannose as directing group.

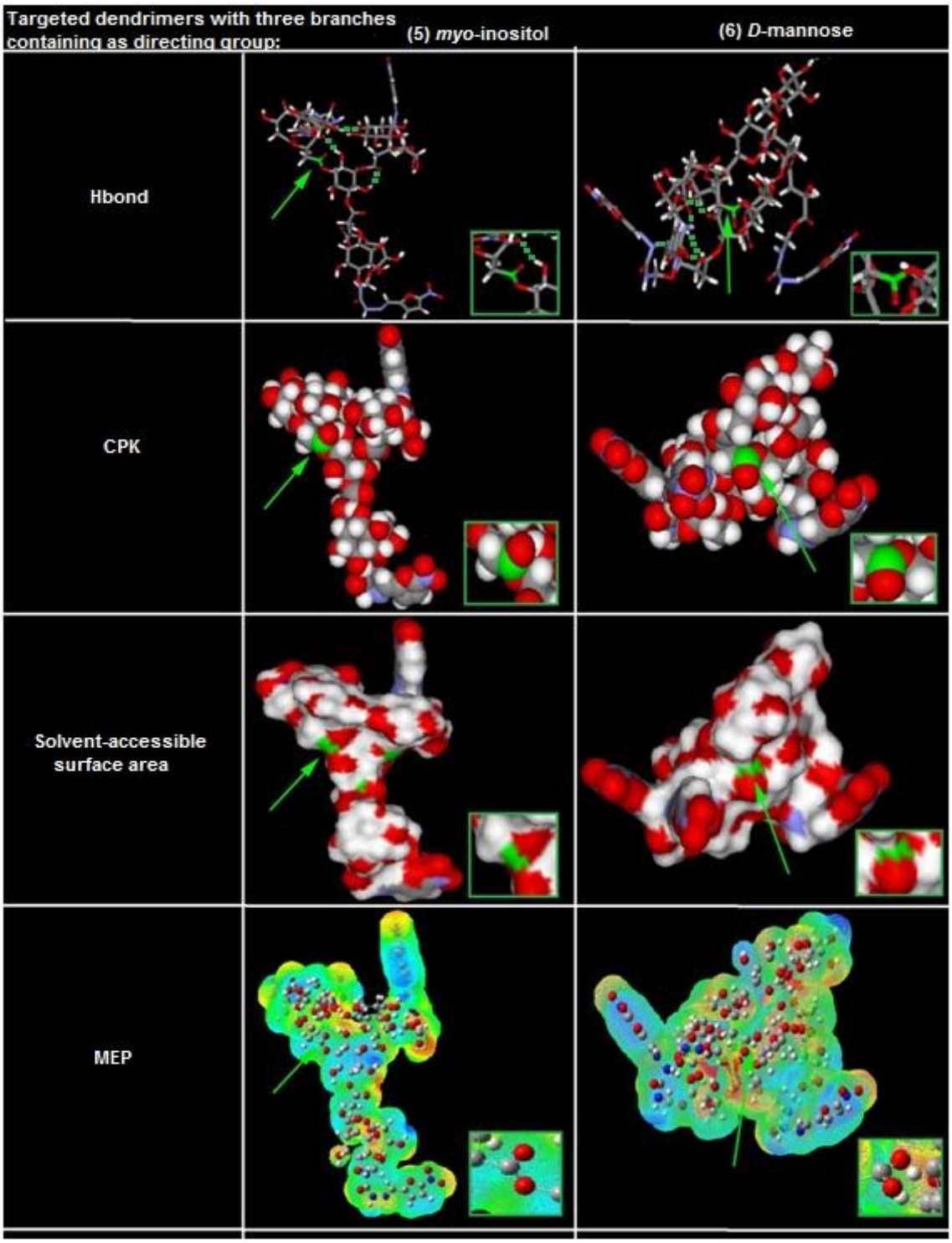


Figure 4. The lowest-energy conformation selected for the targeted dendrimers with three branches containing (5) *myo*-inositol and (6) *D*-mannose as directing group from MD simulation. The dendrimers are represented as stick models and the intramolecular hydrogen bonds as green dashed lines, CPK or space filling models and solvent-accessible molecular surfaces. Carbonyl groups with smaller steric hindrance are highlighted in green in CPK or space filling models and in solvent-accessible surfaces (ViewerLite 4.2). MEPs are represented using a color range from –0.085 (intense red) to 0.085 (intense blue) (GaussView 3.0). Color scheme: carbon atoms are in gray, nitrogen in blue, hydrogen in white and oxygen atoms are in red.

4. Conclusion

Molecular modeling is an important tool to preliminarily explore the *in vivo* release behavior for the NFOH targeted dendrimers.

In this study, physicochemical properties, such as electrostatic potential mapping and steric hindrance, were evaluated to identify the carbonyl groups with higher electronic deficiency and smaller steric hindrance, which are important features to an enzymatic approximation and, consequently, hydrolytic action. The conformation arrangement found for almost all dendrimer models displayed the carbonyl group near the core (C_1) as the most promising region to function as ester breaking point in the dendrimers' disassembly. However, the molecular model containing two branches with *D*-mannose as directing group presented the carbonyl close to the bioactive agent NFOH (C_4) as the most susceptible to an enzymatic nucleophile attack.

Synthesis and release assays of the dendrimer systems studied herein are being carried out to validate the results obtained in the theoretical approach.

Acknowledgment

The authors are grateful to FAPESP (01/01192-3), scholarships (10/3651-4 and 07/59416-0), to CNPq for the financial support and to the Chem21 Group, Inc., for the MOLSIM 3.2 academic license.

References

[1] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R.W. Peeling, J. Alvar and M. Boelaert, Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control?, Nat. Rev. Microb. 5 (2007), 873-882.

[2] S.L. Croft, S. Sundar and A.H. Fairlamb, Drug resistance in leishmaniasis, Clin. Microb. 19 (2006), 111-126.

[3] U. González, M. Pinart, L. Reveiz, M.R. Pardo, J. Tweed, A. Macaya and J. Alvar, Designing and reporting clinical trials on treatments for cutaneous leishmaniasis, Clin. Infec. Dis. 51 (2010), 409-419.

[4] J.A.L. Lindoso and A.A.B.P. Lindoso, Neglected tropical disease in Brazil, Rev. Inst. Med. Trop. SP. 51 (2009), 247-253.

[5] H. Neuber, Leishmaniasis, J. Dtsch Dermatol. Ges. 6 (2008), 754-765.

[6] World Health Organization, Report of a meeting of the WHO expert Committee on the Control of Leishmaniasis, WHO Techn. Rep. Ser. 949 (2011), 1-46.

[7] M.C. Chung, E.I. Ferreira, J.L. Santos, J. Giarolla, D.G. Rando, A.E. Almeida, P.L. Bosquesi, R.N. Menegon and L. Blau, Prodrugs for the treatment of neglected diseases, Molec. 13 (2008), 616-677.

[8] M.C. Chung, R.V.C. Güido, T.F. Martinelli, M.F. Gonçalves, M.C. Polli, K.C.A. Botelho, E.A. Varanda, W. Colli, M.T.M. Miranda and E.I. Ferreira, Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethhylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone produg, Bioorg. Med. Chem. 11 (2003), 4779-4783.

[9] C. Davies, R.M. Cardoso, O.S. Negrette, M.C. Mora, M.C. Chung and M.A. Basombrío, Hydroxymethylnitrofurazone is active in a murine model of Chagas' disease, Antimicrob. Ag. Chemother. 54 (2010), 3584-3589.

[10] K.S.C.R. Santos, J.R. Matos and E.I. Ferreira, Synthesis and chemical characterization of a polymeric prodrug for prolonged release of nitrofurazone, Macrom. Symp. 299-300 (2011), 113-123.

[11] M. C. Chung, A.T. Silva, L.F. Castro, R.V.C. Güido, J.C. Nassute and E.I. Ferreira, Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos, Rev. Bras. Cienc. Farm. 41 (2005), 155-179.

[12] A.T.A. Silva, L.F. Castro, R.V.C. Güido, M.C. Chung and E.I. Ferreira, Advances in prodrug design, M. Rev. Med. Chem. 5 (2005), 893-914.

[13] P. Ettmayer, G.L. Amidon, B. Clement and B. Testa, Lesson learned from marketed and investigational prodrugs, J. Med. Chem. 47 (2004), 2393-2404.

[14] B. Testa, Prodrugs research: fertile or futile, Bioc. Pharmac. 68 (2004), 2097-2106.

[15] B. Klajnert and M. Bryszewska, Dendrimers: properties and applications, A Bioc. Pol. 48 (2001), 199-208.

[16] A. D´Emanuele and D.D. Attwood, Dendrimer-drug interaction, Adv. Drug Deliv. 57 (2005), 2147-2162.

[17] Y. Cheng, Z. Xu, M. Ma and T. Xu, Dendrimers as drug carriers: applications in different routes of drug administration, Pharm. Sci. 97 (2008), 123-143.

[18] J. Giarolla and E.I. Ferreira, EI Patent 018070068714, 2007 (under analysis).

[19] J. Giarolla, D.G. Rando, K.F.M. Pasqualoto, M.H. Zaim and E.I. Ferreira, Molecular modeling as a promising tool to study dendrimer prodrugs delivery, J. Mol. Struct.: THEOC. 939 (2010), 133-138.

[20] J. Giarolla, K.F.M. Pasqualoto, D.G. Rando, M.H. Zaim and E.I. Ferreira, Molecular modeling study on the disassembly of dendrimers designed as potential antichagasic and antileishmanial prodrugs, J. Mol. Mod. 18 (2012), 2257-2269.

[21] M.E. Drew, C.K. Langford, E.M. Klamo, D.G. Russell, M.P Kavanaugh and S.M. Landfear, Functional expression of a myo-inositol; H Symporter from Leishmania donovani, Mol. Cell. Biol. 15 (1995), 5508-5515.

[22] Y.D. Paila, B. Saha and A. Charropadhyay, Amphotericin B inhibits entry of Leishmania donovani into primary macrophages, Biochem. and Bioph. Res. Commun. 399 (2010), 429-433.

[23] N.L. Allinger, Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms, J. Am. Chem. Soc. 99 (1977), 8127-8134.

[24] Hypercube, Inc., Hypoerchem program for Windows, 7V., Hypercube, Inc, Gainesville, FL, 2002.

[25] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov and P.E. Bourne, The Protein Data Bank, Nucl. Ac. Res. 28 (2000), 235-242.

[26] R.N. Pruit, B. Chagot, M. Cover, W.J. Chazin, B. Spiller and D.B. Lacy, Structure-function analysis of inositol hexakisphosphate-induced autoprocessing in Clostridium difficile toxin A, J. Biol. Chem. 284 (2009), 21934-21940.

[27] M. Sundaramoorthy, M.H. Gold and T.L. Poulos TL, Ultrahigh resolution structure of manganese peroxidase from Phanerochaete chrysosporium implications for the catalytic mechanism. J. Inorg. Bioc. 104 (2010), 683-690.

[28] J. Martinez, S. Mancini, E. Tauberger, C. Weise, W. Saenger and M. Solioz, Regulation and structure of YahD, a copper-inducible serine hydrolase of Lactococcus lactis IL1403, Fems. Microbiol Lett. 314 (2011), 57-66.

[29] A.C. Doriguetto, C.H.T.P. Silva, J. Ellena, G.H.G. Trossini, C.M. Chin and E.I. Ferreira, 5-nitro-2-furaldehyde N-(hydroxymethyl)semicarbazone, A. Crystallog. 61 (2005), 2099-2101.

[30] M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Heally and J.J.P. Stewart, Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model, J. Am. Chem. Soc. 107 (1985), 3902-3909.

[31] D. Doherty, MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software - User's Guide, 3.2V., The Chem21 Group Inc., Lake Forest, IL, 1997.

[32] J.S. Tokarski and A.J. Hopfinger, Prediction of ligand-receptor binding thermodynamics by free energy force field, J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37 (1997), 792-811.

[33] C.M. Breneman and K.B. Wiberg, Detemining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis, J. Comp. Chem. 11 (1990), 361-373.
[34] Gaussian, Inc. Gaussian 03W for Windows, 6V, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 1995-2003.
[35] M. Connolly, Analytical molecular surface calculation, J. Appl. Cryst. 16 (1983), 548-558.
[36] Accelrys, Inc. ViewerLite, 4.2V, Accelrys Inc., San Diego, CA, 2001.
[37] M. Connolly, Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids, Science 221 (1983), 709-713.