

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Departamento de Farmácia

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÁRMACO E MEDICAMENTOS**  
**ÁREA DE INSUMOS FARMACÊUTICOS**

Estudos de síntese de dendrons dirigidos de NFOH com potencial  
antichagásico e modelagem molecular do receptor de manose de  
macrófagos

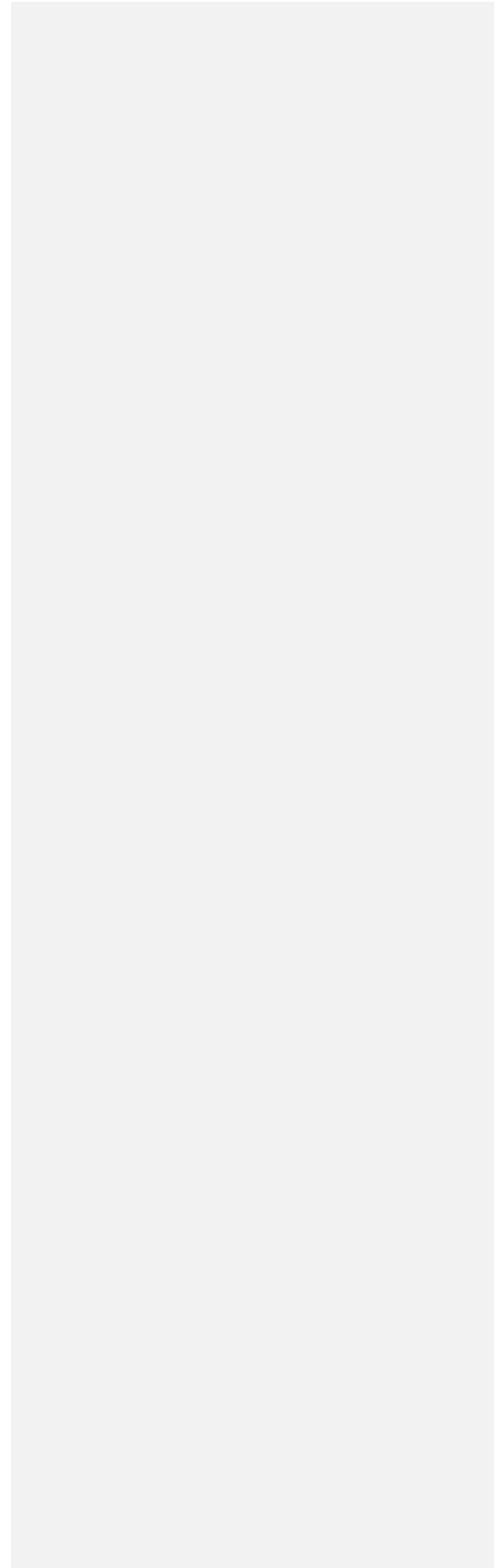
Lucas Adriano do Nascimento

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Igne Ferreira

**SÃO PAULO**

Dezembro de 2023

**VERSÃO CORRIGIDA**



Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da Publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB -8/5562

N244	Nascimento, Lucas Adriano do Estudos de síntese de dendrons dirigidos de NFOH com potencial antichagásico e modelagem molecular do receptor de manose de macrófagos / Lucas Adrianodo Nascimento. - São Paulo, 2023. 68 p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne
	1. Latenciação. 2. Doença de Chagas. 3. Hidroximetilnitrofurural. 4. Dendrons dirigidos. 5. Receptor de manose. I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

Lucas Adriano Nascimento

Estudos de síntese de dendrons dirigidos de NFOH com potencial  
antichagásico e modelagem molecular do receptor de manose de  
macrófagos

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dra. Elizabeth Igne Ferreira

orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

---

3º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.

## **Dedicatória/Agradecimentos**

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Igne Ferreira, pela oportunidade de desenvolver o mestrado sob sua orientação. O apoio que tive, mesmo frente a tantos desafios, foi essencial para que conseguisse desempenhar meu trabalho. Obrigado por nunca me deixar perder perspectiva, nem cair em armadilhas e buracos que fiz pelo caminho.

A meu amigo e mentor, Gláucio, por acreditar em minha capacidade intelectual e científica, e pela sensibilidade e direcionamento profissional e pessoal. Você está e estará sempre na minha história.

A meus amigos, Simion, André, Felipe, Beatriz e Erick, por me ouvirem nos momentos de batalha e de súplica, e por me lembrarem que não estou perdido. Talvez seja difícil colocar em palavras o que isso significa para alguém como eu, mas vou tentar: a solidão não me assombra enquanto estou com vocês.

Aos dois psicólogos, André e Talita, que possibilitaram sair da nuvem preta em minha mente e entender como viver melhor. Minha saúde mental não se deteriorou graças ao suporte de ambos.

À minha família, que, mesmo frente a tudo o que aconteceu especialmente após a pandemia, me deu espaço e conforto para desenvolver meu trabalho, e poder viver o melhor possível.

A meus colegas de laboratório do LAPEN-USP, por me fazer sentir contente em estar com vocês, e por confiarem em mim quando pude ajudar.

Aos alunos da graduação que me consultaram, perguntaram, criticaram e elogiaram durante minhas monitorias. Sempre sonhei em ser professor; ter o retorno gratuito de vocês só me fez ter certeza disso.

À Universidade de São Paulo, pela infraestrutura e fomento para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“E se somos Severinos  
iguais em tudo na vida,  
morremos de morte igual,  
mesma morte severina:  
que é a morte de que se morre  
de velhice antes dos trinta,  
de emboscada antes dos vinte,  
de fome um pouco por dia  
(de fraqueza e de doença  
é que a morte severina  
ataca em qualquer idade,  
e até gente não nascida).”*

MELO Neto, João Cabral de. Morte e Vida Severina  
e Outros Poemas em Voz Alta. Rio de Janeiro: José  
Olympio, 1974. p. 73-79.

## RESUMO

NASCIMENTO, L.A. **Estudos de síntese de dendrons dirigidos de NFOH com potencial antichagásico e modelagem molecular do receptor de manose de macrófagos** 2023, **68p**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A doença de Chagas, considerada doença extremamente negligenciada, acomete mais de 6 milhões de pessoas ao redor do mundo e mais de 75 milhões de pessoas vivem sob risco da doença. Considerada endêmica em 21 países da América Latina. No Brasil, grassa, sobretudo, na região Norte, especialmente, na região amazônica. Apesar de se constituir em risco global, a doença de Chagas conta com apenas com dois fármacos, o benznidazol e o nifurtimox, que, além de tóxicos, não apresentam eficácia significativa na fase crônica da parasitose. Assim sendo, torna-se imperativa a busca por quimioterápicos mais eficazes, mormente na fase crônica da doença. A introdução de novos fármacos da terapêutica várias fases, consumindo tempo e recursos. No entanto, há processos que permitem a otimização de fármacos já existentes e de compostos bioativos, com vistas à busca de candidatos a fármacos, que, uma vez bem-sucedidos nos ensaios clínicos, são aprovados para uso terapêutico. Entre esses processos, destaca-se a latenciação, forma de aprimoramento de propriedades farmacêuticas, farmacocinéticas e, indiretamente, farmacodinâmicas, que utiliza, em geral, transportadores para a resolução de problemas dessas naturezas. Os transportadores variam de acordo com o problema a ser resolvido e, entre eles, os dendrons e dendrímeros podem ser ressaltados pela sua natureza química, que permite a ligação de várias moléculas de fármacos/compostos bioativos e, também, de grupos diretores para certos compartimentos ou células. Dessa forma, podem-se obter fármacos dirigidos, que se constituem em formas latentes de alta seletividade. Face ao exposto e, estimulados pela busca de novas alternativas terapêuticas para a doença de Chagas, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de dendrons dirigidos, por meio de manose, derivados de hidroximetilnitrofuril (NFOH). Esse composto foi mostrou-se altamente ativo contra *T. cruzi*, também na fase crônica NFOH e menos tóxico que o protótipo e o benznidazol. Efetuaram-se estudos para a síntese desses compostos derivados de dendron triazólico, sintetizado através de *click chemistry*, tendo a manose como grupo diretor para os macrófagos, onde, também, são encontrados os amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Obtiveram-se alguns intermediários, que foram caracterizados por RMN 1H e 13C. A rota sintética proposta não pôde ser finalizada. Por outro lado, efetuaram-se estudos de modelagem molecular, utilizando-se dinâmica molecular, com o intuito de conhecer como se dá a interação da manose e de polimanosídeos com seu respectivo receptor e como se realiza a liberação do composto bioativo da ligação com o dendron. Anteriormente, procedeu-se à caracterização da biologia estrutural do receptor de manose e de suas estruturas primárias, secundárias e terciárias, com ênfase para o domínio CRD4 o papel do cálcio principal na interação com o monossacarídeo. A movimentação do domínio foi muito pouco diferente nos meios simulados (neutro, ácido, contendo ligantes e contendo o cálcio auxiliar), evidenciado pelo RMSF e estudo de PCA desses sistemas. Foi possível concluir que este domínio não apresenta nenhuma alteração conformacional responsável pela liberação de ligantes em meio lisossômico, e que o cálcio auxiliar e os ligantes não causam impactos na estabilidade conformacional do CRD4. Há necessidade de mais estudos para o conhecimento dos requisitos estruturais envolvidos na da formação do complexo receptor-composto bioativo.

**Palavras-chave:** latencição; doença de Chagas; hidroximetilnintofural; dendrons dirigidos; receptor de manose.



## ABSTRACT

NASCIMENTO, L.A. **Studying the synthesis of NFOH targeted dendrons, potentially active in Chagas disease, and the molecular modeling of manose receptor from macrophages**, 2023, **68p**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Chagas disease, considered an extremely neglected one, affects more than 6 million people all over the world, with more than 75 million people living under its risk, while endemics in 21 countries in Latin America. In Brazil, it propagates, mainly in North region, especially in Amazon region. Although being a global risk, only two drugs, benznidazole and nifurtimox, are currently available for Chagas disease. These drugs are toxic and not significantly efficient against the chronic phase of the disease. Therefore, the search for more active chemotherapeutic agents, mainly against the chronic phase of the parasitosis, is imperative. The introduction of new drugs in the therapeutics involves many phases, consuming time, and money. Notwithstanding, there are processes that allow either drugs or bioactive compounds to be optimized, towards drug candidates. These derivatives, once well-succeeded in the clinical trials, can be approved for therapeutic uses. Among those processes, prodrug design stands out. It is a way to improve the pharmaceuticals, pharmacokinetics and, indirectly, pharmacodynamics, properties of drugs/bioactive compounds, which requires adequate carriers, in general, for these problems' solution. The carriers vary according to the problem to be solved, and, among them, dendrons and dendrimers can be emphasized due to their chemical nature, which allows the link of many molecules/bioactive compounds and of directing groups to specific compartments or cells. Thus, targeted drugs, which are latent forms of drugs/bioactive compounds with high selectivity. In this connection and stimulated by the search for new therapeutic alternatives for Chagas disease, the objective of this work was obtaining hydroxymethylnitrofurazone (NFOH) targeted dendrons, by means of mannose, as directing groups. NFOH is highly active against *T. cruzi*, even in chronic phase of the disease, and less toxic than the prototype and benznidazole. Studies have been developed to synthesize these compounds with a triazole dendron, planned to be obtained by click chemistry. Mannose was designed to be the directing groups to macrophages, where the *T. cruzi* amastigotes can also be found. Some intermediaries have been obtained and structurally characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, but the proposed synthetic route could not be finished. On the other hand, molecular modeling studies have been developed, using molecular dynamics, with the aim to know how the interaction of mannose, and also of polymannoside, occur with the specific receptor, and how NFOH is released from its linkage to the dendron. The structural biology characterization, as well as of primary, secondary and tertiary structures of the mannose receptor was previously performed, with emphasis on CRD4 and main calcium role in the interaction of the mannoside. All systems simulated (neutral medium, acid medium, complexes with ligands and auxiliary calcium) showed little movement differences when analyzed by RMSF and PCA calculations. It was possible to conclude that this domain shows no conformational changes involved in ligand releasing in lysosomal environment and its conformation is not altered when in presence of ligands or the auxiliary calcium. Much more studies are needed to the knowledge of the structural requirements to the complex receptor-drug-compound bioactive to the receptor.

**Keywords:** prodrug design; Chagas disease; hydroxymethylnitrofurazone; targeted dendrons; mannose; mannose receptor.

## Sumário

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Doença de Chagas: aspectos socioeconômicos e epidemiológicos .....	11
1.2 Ciclo de vida e metabolismo do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	12
1.3 Fármacos antichágasicos.....	14
1.4 Latenciação e fármacos dirigidos .....	17
1.5 Dendrímeros.....	20
1.6 Modelagem molecular e o receptor de manose de macrófagos .....	22
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA .....	26
2.1. Objetivos específicos .....	28
2.1.1 Síntese, caracterização estrutural e físico-química e modelagem molecular do dendron dirigido de hidroximetilnitrofurural (NFOH) .....	28
2.1.2 Estudo da estrutura e função do receptor de manose de macrófagos (RMM) à luz da modelagem molecular .....	28
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	29
3.1 Estudo da síntese, caracterização estrutural e físico-química do dendron manosilado .....	29
3.1.1. Material e Métodos .....	29
3.1.1.3 Síntese e ativação do NFOH .....	31
3.2 Estudo da estrutura e função do receptor de manose de macrófagos (RMM) sob luz da modelagem molecular.....	40
3.2.1. Material e métodos.....	41
3.2.1.1 Material .....	41
3.2.1.2 Métodos.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44

	10
4.1 Síntese .....	44
4.2 Estudos de Modelagem Molecular .....	50
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	57
5.1 Estudo da síntese, caracterização estrutural e físico-química do dendron manosilado .....	57
5.2. Estudo da estrutura e função do receptor de manose de macrófagos (RMM) sob luz da modelagem molecular.....	57
6. REFERÊNCIAS .....	59

**Comentado [LA1]:** Correção do sumário

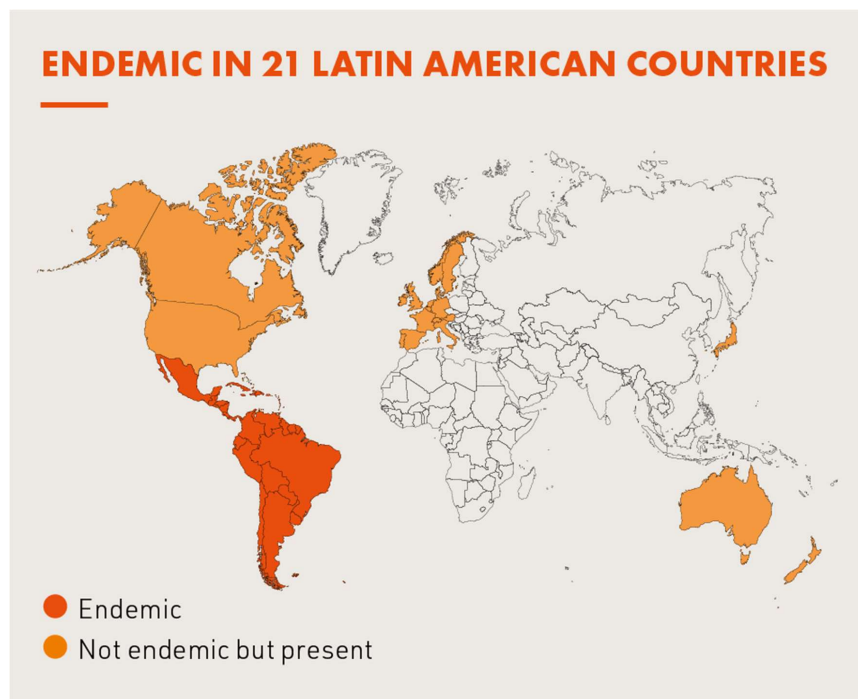
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Chagas: aspectos socioeconômicos e epidemiológicos

A doença de Chagas (DC) é parte de um grupo de enfermidades infecciosas classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN). Este termo, cunhado em 1964 (KEATING, 2014), é um importante marco na pesquisa ao combate de tais doenças, já que explicita o peso da fragilidade socioeconômica das populações assoladas por elas: enquanto as condições precárias de vida dos pacientes propiciam o desenvolvimento da doença, a sua instalação intensifica o quadro de vulnerabilidade.

A DC acomete mais de 6 milhões de pessoas ao redor do mundo (DNDi, 2022), sendo diagnosticada em 30% dos casos, é considerada endêmica em 21 países da América Latina continental (Figura 1), causando neste continente mais mortes que outras doenças parasitárias. Diversas políticas públicas nestes países foram criadas ao longo das últimas décadas e obtiveram sucesso especialmente no controle da transmissão vetorial pelos triatomíneos (SILVEIRA, DIAS, 2011); paradoxalmente, entretanto, o aumento no número de casos fora do ciclo rural clássico da doença caracteriza-a, para a OMS (2022), como um risco à saúde global, com mais de 75 milhões de pessoas vivendo sob risco da doença. Este aumento na distribuição dos casos de DC – especialmente no hemisfério Norte – é explicado pelas diversas mudanças políticas e sociais nos países de origem impulsionando a migração, tanto de meios rurais para meios urbanos, como de um país para outros. O desconhecimento da população e despreparo dos profissionais de saúde de regiões não-endêmicas para lidar com a DC permite sua instalação em ciclos de vida atípicos (BERN, 2015).

**Figura 1** – Distribuição mundial da DC



Fonte: Drugs for Neglected Diseases (DNDi), 2023

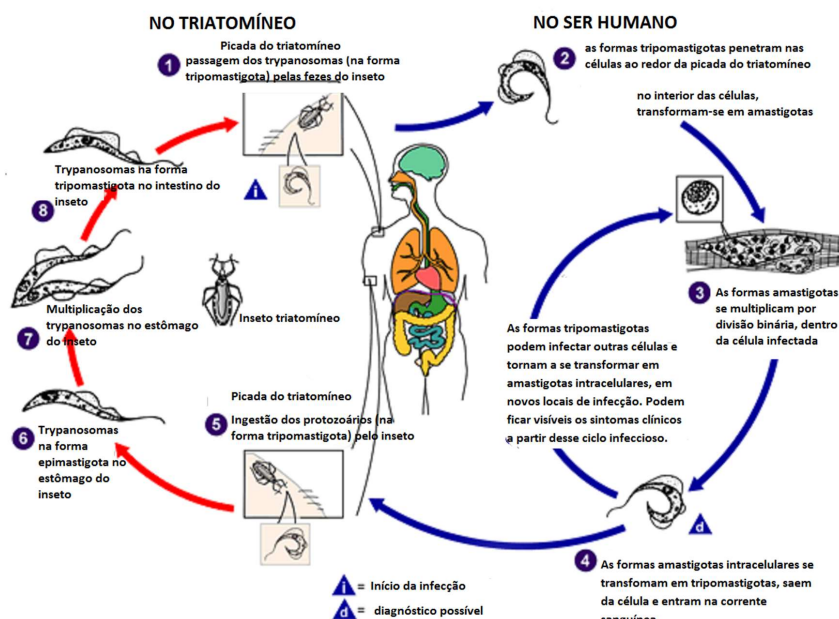
No Brasil, a DC afeta em especial a região Norte, com foco nos Estados amazônicos (MS, 2021). O controle do vetor triatomíneo através de políticas públicas não foi capaz de erradicar a doença, apesar da radical diminuição de casos. Transfusão sanguínea e transmissão vertical, de gestantes para o feto, além da via oral, com o consumo de alimentos contendo insetos contaminados triturados e suas fezes, se apresentam como importantes meios de transmissão da doença atualmente, bem como a instalação de ciclos de vida em novos hospedeiros substitutos ao barbeiro (FERREIRA, SILVA, 2006).

## 1.2 Ciclo de vida e metabolismo do *Trypanosoma cruzi*

Causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, a transmissão clássica da DC se dá quando este é transportado para sangue do paciente pelas fezes do triatomíneo *Triatoma infestans*, conhecido informalmente como “barbeiro” no Brasil. Este é um inseto de clima quente e hábitos noturnos, um hametófito que se esconde durante o dia em pilhas de folhas, galhos e em frestas de construções humanas, como casas de alvenaria e materiais

para suas construções. Quando pica um animal, defeca próximo à ferida; o reflexo de coçar arrasta o material contaminado para a lesão, e possibilita o prosseguimento do ciclo de vida do parasita (TYLER, ENGMAN, 2001; CDC, 2022) (Figura 2).

**Figura 2** – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros intermediário (triatomíneo) e definitivo (humano)



Fonte: Adaptado de Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2019.

O barbeiro e outros triatomíneos agem como hospedeiros temporários do *T. cruzi*, pois o parasita necessita transitar por seu trato gastrointestinal para diferenciar-se da forma epimastigota – não-infectiva – para a forma tripomastigota e multiplicar-se. Transportados para a corrente sanguínea, os tripomastigostas são capazes de penetrar ativamente em diversos tecidos, com propensão para penetração em células imunes, como os macrófagos. No meio intracelular, o parasito passa por uma nova diferenciação e assume a forma amastigota, altamente replicativa através da fissão binária. A proliferação celular do parasita é continuada até o ponto de diferenciar-se novamente na forma tripomastigota, o que leva ao rompimento celular e liberação do parasita na corrente sanguínea. Nesta, os tripomastigotas ficam disponíveis para se instalar em novos tecidos ou retornar ao vetor hospedeiro e voltar à forma epimastigota, reiniciando seu ciclo reprodutivo (TYLER, ENGMAN, 2001; CDC, 2022).

O *T. cruzi* se aproveita da resposta imune do hospedeiro produzida por elementos celulares, como macrófagos ativados, para a manutenção de seu ciclo de vida intracelular (GAZZINELLI et al., 1992). A ativação clássica destas células pela presença do parasita confere a elas caráter *MI*, fazendo com que expressem genes voltados para ação citotóxica – dentre eles, genes responsáveis pela produção de espécies oxidativas iROS e iNOS. Em tecidos infectados, o *T. cruzi* é capaz de modular o tônus da resposta de macrófagos, levando-os a uma resposta menos citotóxica. Esta reprogramação celular se deve à ativação da resposta imune como por vias independente de IFN- $\gamma$ , na fase aguda, e através da expressão de TGF- $\beta$ , na fase crônica; as duas condições levam à baixa produção de iNOS em especial devido à mudança metabólica em favor de vias da L-argininase, que competem diretamente com a produção das espécies radicalares. É possível identificar infiltrados imunes ricos em macrófagos em diferentes tecidos infectados pelo *T. cruzi* em modelos animais de DC crônica, evidenciando a correlação entre tal elemento celular e o parasita (PELUFFO et al., 2004; NAGAJYOTHI et al., 2012).

Na fase aguda da DC, a parasitemia é baixa, uma vez que a maioria da população do patógeno se encontra na forma amastigota intracelular; ainda sim, com pouco tempo de infecção é possível identificar IgM e IgG-anti *T. cruzi*. O aparecimento de elementos moleculares da resposta imune adaptativa não é sinal de controle da infecção, considerando-se que os níveis se mantêm os mesmos até o agravamento da doença. A fase crônica, por sua vez, é caracterizada pelo alto infiltrado celular em diversos tecidos, o que traz um remodelamento em resposta ao dano oxidativo ocasionado. A hipermegalia dos tecidos cardíaco, gastrointestinal e baço são desenvolvimentos comuns, com acentuada queda da função em acordo com o estadiamento do processo. O transplante de órgãos é uma opção para pacientes em estado grave, mas com benefícios limitados, uma vez que não há opções terapêuticas curativas eficazes para a DC crônica que propiciam a infecção do tecido transplantado e reinstalação do quadro crônico. Diferente da forma vetorial clássica, a transmissão da DC por via oral apresenta casos agudos com parasitemia mais intensa e cronicidade precoce do quadro (LEWIS et al., 2014).

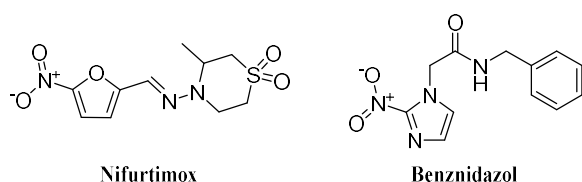
### 1.3 Fármacos antichágasicos

Disponíveis hoje para o tratamento da DC aguda e crônica estão os fármacos nifurtimox e o benznidazol (Figura 3), sendo apenas o primeiro aprovado para uso no Brasil. Ambos são pró-fármacos bioprecursores citotóxicos, que levam o parasita à morte



por estresse oxidativo, resultante do bloqueio dos mecanismos de desintoxicação de espécies radicalares. No meio intracelular do tripanossomatídeo, os fármacos têm seus grupos nitro metabolizados por nitrorredutases, dando origem, respectivamente, a radicais nitro-ânions e compostos contendo grupos nitroso e hidroxilamina, extremamente reativos. Estes agentes se ligam rapidamente a macromoléculas pela formação de tiol-conjugados, causando seu mau-funcionamento e eventual morte celular. Dentre as principais enzimas danificadas por estes conjugados, aquelas do metabolismo redox do parasita, em especial a tripanotiona redutase, empregadas na desintoxicação destas moléculas, têm seu funcionamento interrompido, estendendo o dano oxidativo dos fármacos (DIAS et al., 2009; HARDMAN, LIMBIRD, GILMAN, 2005).

**Figura 3** – Estrutura química do nifurtimox e benznidazol.



Fonte: Produção do autor.

O nifurtimox (Figura 3), apesar de capaz de controlar a parasitemia, apresenta baixa biodisponibilidade oral resultante do alto metabolismo de primeira passagem e rápida excreção renal do composto *per se* e de seus metabólitos (GONZÁLEZ-MARTIN, 1999). Ademais, o tratamento com este fármaco é marcado por eventos adversos graves, que acometem principalmente o sistema gastrointestinal, podendo atingir, com menos frequência, o sistema nervoso central para efeitos mais persistentes (JACKSON et al., 2010; BRUNTON et al., 2018). Um dos principais limitantes do nifurtimox como ferramenta terapêutica é sua baixa atividade na fase crônica da doença, quando grande parte dos casos de DC são descobertos (GONZÁLEZ-MARTIN, 1999).

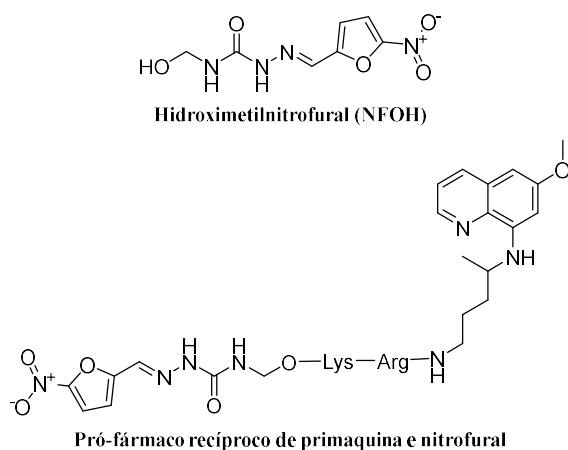
O benznidazol (Figura 3) é um composto com rapidamente absorvido e de alta biodisponibilidade quando administrado por via oral, mas estes achados são utilizados sem o conhecimento profundo do perfil farmacocinético a respeito das demais etapas envolvidas na fase farmacocinética de ação do fármaco. Como resultado, doses recomendadas para o tratamento da DC parecem manter concentrações plasmáticas acima do que é seguro (BRUNTON et al., 2018). Como o nifurtimox, o benznidazol também é

mais eficaz na fase aguda da DC e não é capaz de melhorar o prognóstico pós-terapia na fase crônica (CALDAS, SANTOS, NOVAES, 2019). É um tratamento permeado por eventos adversos, como urticária, problemas gastrointestinais, e neuropatia periférica e supressão de medula óssea, diminuindo a adesão dos pacientes (BRUTON et al., 2018).

Durante a síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina, uma estratégia de latenciação combinada com reposicionamento de fármacos para o tratamento da DC, o intermediário de síntese hidroximetilnitrofural (NFOH) (Figura 4) se mostrou um potencial antichagásico (CHUNG, 1996), com importante segurança em modelos animais da DC. É um interessante agente para o tratamento especialmente da DC crônica, na qual mostrou maior poder curativo quando em associação com benznidazol (SCARIM et al., 2022) comparado à ação na DC aguda, além de demonstrar segurança em ensaios pré-clínicos (CHUNG et al., 2003; BOSQUESI et al., 2008). Por tais características, foi o composto bioativo escolhido para este trabalho.

**Comentado [HAF2]:** Colocar a figura do pró-fármaco recíproco do NFOH. Eu tenho uma.

**Figura 4** – Estrutura química do NFOH e do pró-fármaco recíproco de primaquina e nitrofurais que deu origem a ele.

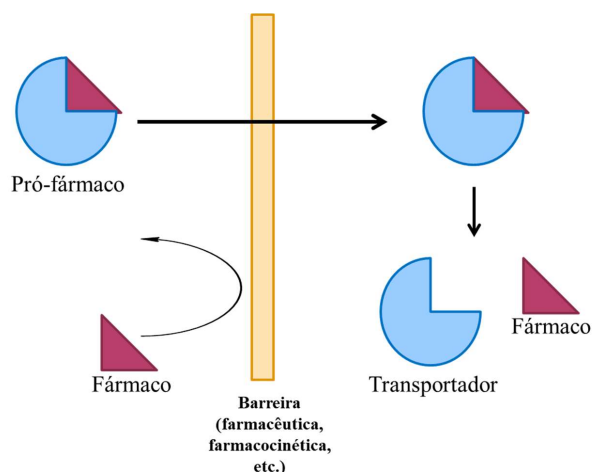


Fonte: Produção do autor.

#### 1.4 Latenciação e fármacos dirigidos

A latenciação é uma estratégia de modificação molecular, que consiste na adição de um grupo químico, o transportador, a um fármaco ou composto bioativo, de forma que a ligação entre ambas as partes seja covalente, mas facilmente clivada em meio biológico. A Figura 5 mostra, esquematicamente, o processo de latenciação. Esta nova molécula, denominada pró-fármaco, possui nenhuma ou amplamente diminuída atividade farmacológica, quando comparada ao composto original. É, pois, considerada latente, mas apresenta diferentes propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, a depender do transportador utilizado. É uma ferramenta de planejamento de fármacos importante para a adequação do perfil farmacológico de um composto bioativo, sendo utilizada para a resolução de problemas como solubilidade e absorção. Tais obstáculos são causadores da perda de inúmeros compostos líderes no desenvolvimento de fármacos – o conhecido “vale da morte”, para o qual sucumbem moléculas com alta toxicidade e baixa eficácia, apesar de importante potência farmacológica (CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005; HUTTUNEN et al., 2011; CHOI-SLEDESKI et al., 2015).

**Figura 5** – Ajuste de parâmetros moleculares pela latenciação.



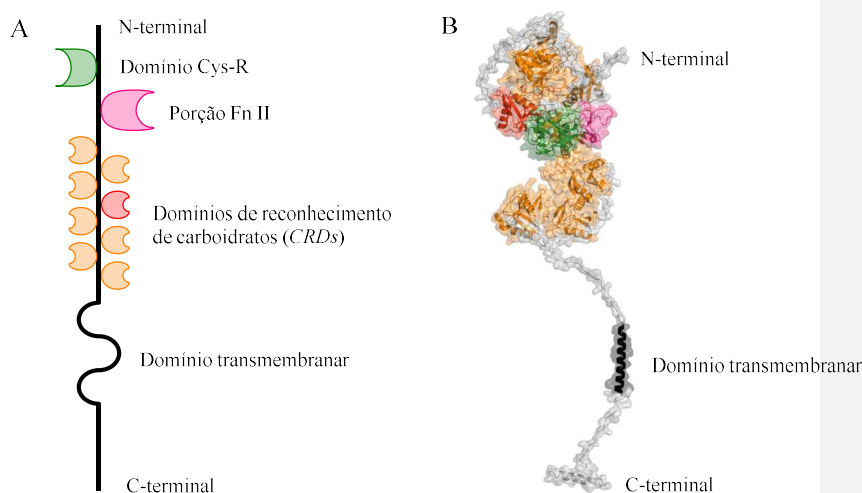
Fonte: Produção do autor.

O direcionamento de fármacos consiste na adição de grupos transportadores com alta afinidade molecular pelo tecido preconizado para a atuação do composto bioativo. Estes pró-fármacos geralmente são construídos ligando moléculas bioativas a compostos químicos altamente captados por tecidos a depender de seus funcionamentos fisiológicos ou fisiopatológicos. A alta concentração do pró-fármaco no tecido de interesse – com clivagem e liberação do fármaco ativo também ali – leva à diminuição de toxicidade, pela limitação da distribuição do composto tóxico, e ao aumento indireto de potência pela rápida saturação do alvo biológico (CHUNG et al., 2005; SILVA et al., 2005; CHUNG et al., 2008; CLAS, SANCHEZ, NOSFINGER, 2014; JEAN JR., FOTSCH, 2012).

Como o macrófago se mostra um componente celular importante na resposta imune e instalação do parasita em tecidos infectados, pode-se utilizar manose como grupo transportador. Dentre os diversos receptores transmembranares disponíveis nesta célula, o de manose (RMM, ou CD206) tem sua expressão alterada em decorrência da mudança de tônus dos macrófagos na presença do *T. cruzi*. Diversos compostos foram planejados e tiveram aumento de concentração intracelular em modelos animais e celulares de outras doenças intimamente ligadas à atividade de macrófagos, especialmente câncer (COESSENS, SCHACHT, DOMURADO, 1997; JI et al., 2000; GAO et al., 2013; ZHU et al., 2013).

O RMM, pertencente à família das lecitinas do tipo C, proteínas contendo cálcio responsável pelo reconhecimento de sacarídeos, destaca-se pela presença de múltiplos domínios dessa natureza (*carbohydrate recognition domains*, CRDs) em sua estrutura (Figura 6) (HU et al., 2019). Além do reconhecimento de carboidratos, o RMM também apresenta um domínio próximo à porção *N*-terminal responsivo a carboidratos sulfatados, marcadores moleculares para captação de hormônios proteicos e, em sequência, uma porção dedicada à interação com colágenos, utilizado na remodelação da matriz tecidual (FEINBERG et al., 2021). Este receptor, então, atua tanto na resposta imune para o reconhecimento de carboidratos na superfície de patógenos quanto na homeostase e reconstrução tecidual, duas facetas complementares do sistema imune (TAYLOR, GORDON, MARTINEZ-POMARES, 2005).

**Figura 6** - Estrutura do RMM.



A – Representação esquemática dos diferentes domínios do receptor, com diferentes cores para cada um; B – estrutura tridimensional obtida por homologia disponibilizada pelo servidor AlphaFold, colorida conforme o esquema ao lado. Em ambos, o CRD-4 foi representado em vermelho dentre os demais CRDs, destacado devido à sua autonomia e importância na ativação por compostos manosilados. Fonte: HU et al., 2018; AlphaFold, 2023.

O direcionamento de fármacos através de transportadores manosilados é bastante explorado na busca por novas estratégias terapêuticas e diagnósticas na oncologia. Os

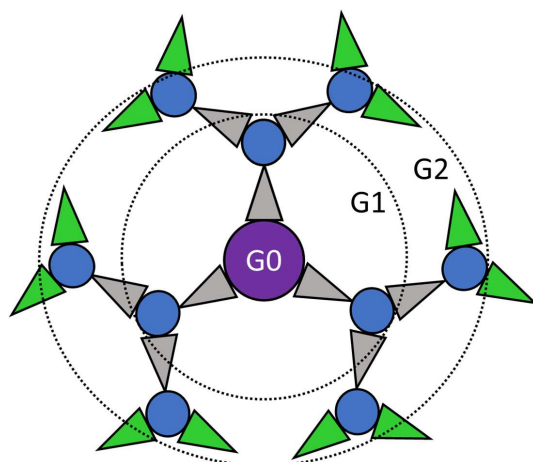
macrófagos associados a tumores (*tumor-associated macrophages*, TAMs) participam ativamente da evasão da resposta imune pelo tecido tumoral e remodelamento da matriz extracelular que o envolve, bem como na distribuição, invasão e instalação de tumores em tecidos distantes (ZHU et al., 2013). Mudança de tônus para a resposta M2 de macrófagos, mais intensa que aquela da DC, é causada pelas células neoplásicas, aumentando a expressão de (metalo)proteínas especializadas no remodelamento tecidual – dentre elas, o RMM, por sua afinidade por macrófagos.

Até o momento, não foi publicado na literatura científica ou em patentes o emprego de manose como transportador diretor para o tratamento da DC aguda ou crônica. É possível ver, no entanto, melhoras terapêuticas com o uso destes compostos em modelos celulares e animais de doenças infecciosas como tuberculose e leishmaniose, DTN causada pela infecção de *Leishmania* sp., grupo de triatomíneos geneticamente próximos ao *T. cruzi*. (ASTHANA et al., 2015).

### 1.5 Dendrímeros

Dendrímeros são compostos nanométricos de natureza polimérica, caracterizados por sua estrutura ramificada e polidispersão peculiar (Figura 8) Similares a polímeros tradicionais, os dendrímeros possuem sua superfície recoberta de grupos funcionais, que dependem dos monômeros que os compõem, mas suas ramificações levam-nos a assumir conformações glomerulares. Por isto, são interessantes veículos biotecnológicos para fins terapêuticos e diagnósticos, sendo capazes de aprisionar fármacos no interior e/ou membrana de tais veículos glomerulares (TOMALIA, FRECHÉT, 2002; LEE et al., 2005).

**Figura 8** – Estrutura esquemática de um dendrímero

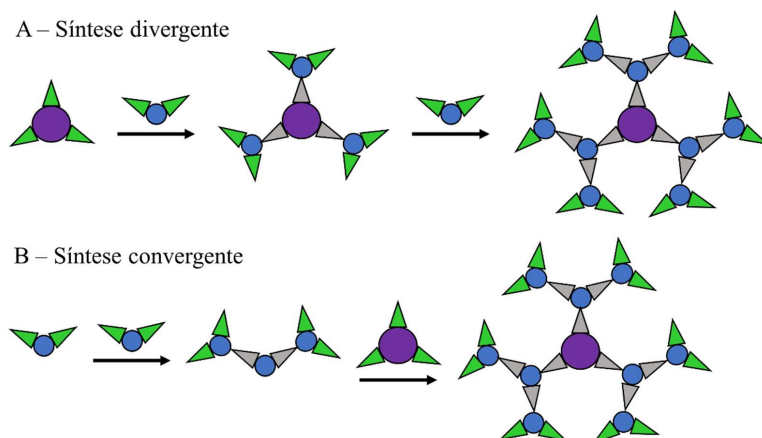


Núcleo em roxo, pontos de ramificação em azul e terminações funcionais em verde.

Fonte: Adaptado de LYU et al., 2019.

A síntese de dendrímicos, tradicionalmente, se dá de forma *divergente* ou *convergente* (Figura 9) A síntese divergente é realizada através de seguidas etapas reacionais sobre um crescente núcleo da estrutura. A cada etapa sintética, uma camada de grupos funcionais é adicionada ao dendrímico. A síntese convergente, por sua vez, é alcançada pela síntese individual das ramificações – *dendrons* – e posterior ligação ao núcleo do dendrímico. Estes dendrons já apresentam diversos grupos funcionais em sua superfície, e são utilizados como veículos *per se* (DUFÈS, UCHEGBU, SCHÄTZLEIN, 2005, LYU et al., 2019).

**Figura 9** – Síntese de dendrímero.



Fonte: Adaptado de LYU et al., 2019.

Dendrímeros e dendrons são bastante utilizados para formulações nanotecnológicas, especialmente através do uso de monômeros conectados entre si por ligações sensíveis a características fisicoquímicas de tecidos alvo. São excelentes nanotransportadores de fármacos antineoplásicos, área onde são frequentemente pesquisados, e permitem a adequação farmacocinética de quimioterápicos bastante tóxicos, além da liberação em massa do composto bioativo no sítio de interesse. O emprego destes transportadores para o tratamento da DC e outras DTN está sendo bastante estudado por nosso grupo (SANTOS et al., 2017; ARAÚJO et al., 2018; GONZAGA et al., 2018; DIAS et al., 2020; GONZAGA et al., 2020).

Comentado [HAF3]: Falta referência

### 1.6 Modelagem molecular e o receptor de manose de macrófagos

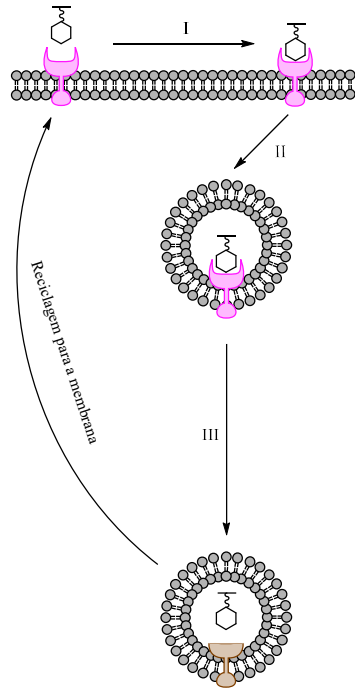
Dentre as diversas ferramentas para o planejamento de fármacos com auxílio computacional (*Computer-aided drug design* – CADD), a modelagem molecular (MM) é uma boa abordagem para explorar e compreender interações entre diferentes macromoléculas biológicas e, entre elas, possíveis ligantes. As estratégias baseadas na estrutura de alvos biológicos (*Structure-based drug design* – SBDD) são úteis quando estas são conhecidas, partindo de estruturas elucidadas por cristalografia de raio X, criomicroscopia eletrônica e ressonância magnética nuclear para o estudo de sua, biologia, molecular. Tal conhecimento se torna muito útil à medida que auxilia na escolha



de ligantes para a obtenção de maior potência biológica. (AMINPOUR; MONTEMAGNO; TUSZYNSKI, 2019)

Quando ativado, o RMM é mobilizado pelo citoesqueleto de actina do meio intracelular e adentra o meio intracelular pela formação de um endossomo. Como está envolvido na inativação digestiva enzimática de compostos que reconhece, o endossomo onde está contido é fundido a lisossomo, organela bastante ácida pela presença de canais de acidificação em sua superfície. Neste meio, existe uma queda na afinidade do RMM por seus ligantes, liberando-os para a digestão no lisossomo. Neste ponto, pela presença de porções envolvidas em reciclagem de proteínas transmembranares, é retornado para a membrana. A queda de afinidade em meio ácido é, provavelmente, decorrente da mudança de carga de determinados resíduos do receptor, causando uma desnaturação reversível da proteína e do complexo RMM-ligante. Este fenômeno, entretanto, ainda não foi mostrado a nível molecular, ao menos não de forma a demonstrar os requisitos estruturais para mobilizar este receptor com outro que não seu ligante natural (HU et al., 2018b, CUMMINGS, 2022).

**Figura 10** – Digestão celular por macrófagos mediada pelo RMM



I: Reconhecimento de compostos endógenos ou exógenos e ativação do RMM; II: Fagocitose, causada pela ativação do citoesqueleto de actina através da porção C-terminal do RMM ativado, com formação de um endossomo (b); III: Fusão do endossomo com o pré-lisossomo para formação do lisossomo funcional, cujo baixo pH, de 4,5, faz com que o RMM perca sua afinidade por seus ligantes, liberando-os para a digestão. Fonte: Produção do autor.

Dos oito CRDs presentes no receptor, o CRD-4 se destaca por sua alta afinidade por sacarídeos quando comparado aos demais. Quando clivados, os demais CRDs apresentam baixa afinidade por ligantes; o CRD-4, entretanto, apresenta *per se*, livre de quaisquer outras porções. Dotado de um sítio específico para o ancoramento de íons cálcio, este domínio consegue quelar cátions  $\text{Ca}^{2+}$  através de cinco resíduos carbonílicos em sua superfície, que se voltam para a superfície do receptor, capacitando-o para reconhecimento de seu ligante (FEINBERG et al., 2000, FEINBERG et al., 2021; CUMMINGS, 2022).

Inicialmente, estudos de mutagênese direcionada demonstraram a importância de determinados resíduos na atividade da porção CRD-4 para o reconhecimento de manose. Além disto, também foi demonstrada a necessidade de um *segundo* íon  $\text{Ca}^{2+}$  em outro sítio do domínio (MULLIN, HITCHEN, TAYLOR, 1997). As primeiras cristalografias desta porção do RMM (FEINBERG et al., 2000), entretanto, apresentaram-na em uma forma inativa do CRD4, na qual, apesar da presença do  $\text{Ca}^{2+}$  em seu sítio de reconhecimento de manose (*mannose-binding site*, MBS), a conformação obtida na cristalização não foi capaz de interagir com manose. Importantes características do CRD-4, todavia, foram demonstradas, mas pouco pôde ser constatado sobre como se dá a afinidade dele por carboidratos. Cristalografias mais recentes do domínio CRD-4 foram publicadas em 2021 por Feinberg e colaboradores, demonstrando claramente sua conformação tridimensional ativa bem como diversos complexos com compostos manosilados. Através delas, é possível constatar como os resíduos que compõem o MBS se conformam diante do Ca principal e como auxiliam na interação com seus ligantes, e quais resíduos estão envolvidos na quelação do segundo íon  $\text{Ca}^{2+}$ , o Ca auxiliar. Esta segunda informação é bastante interessante para a discussão a respeito da atuação biológica do RMM dentro da resposta imune.

Através da modelagem molecular, especialmente com o uso de simulações de dinâmica molecular (*molecular dynamics*, MDs), é possível compreender fenômenos moleculares envolvendo uma ou mais macromoléculas através da observação da mobilização de diferentes átomos presentes nesses sistemas e como se comportam em relação aos demais. Com tais ferramentas, a investigação de fenômenos regulatórios, metabólicos e de sinalização se torna bastante facilitada, especialmente hoje com a grande disponibilidade de algoritmos de mecânica molecular e quântica disponíveis para a construção de sistemas multiatômicos.

Até a confecção deste trabalho, poucos estudos de MM do RMM foram publicados. Em especial, os disponíveis na literatura abordam cristalografias da porção CRD4 para a demonstração molecular da interação entre o RMM e ligantes dirigidos para ele. Publicação basilar de Hu e colaboradores (2019) a respeito da conformação do RMM e sua relação com o pH e a atividade explícita que há importante e extenso envelhecimento do receptor mediante a acidificação do meio em que se encontra. Desta forma, há ainda um vasto campo para ser explorado, uma vez que não foram elucidados os mecanismos de queda de afinidade do RMM por seus ligantes para liberá-los no lisossomo. Tal

conhecimento é extremamente útil para o desenvolvimento de novas moléculas, visto que auxilia na busca de compostos bioativos, que se aproveitem das diferentes afinidades dos dois estados conformacionais do RMM, obtendo melhor liberação no lisossomo. Além disso, o conhecimento a respeito da biologia molecular do receptor pode auxiliar no desenvolvimento de ligantes com diferentes grupos diretores que se ligam a ele com alta afinidade.

## 2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

A DC apresenta um risco para a saúde global, afetando ao menos 6 milhões de indivíduos por todo o mundo. A alta incidência em países da América Latina continental, incluindo o Brasil, é decorrente das propícias características geofísicas de seus territórios, e é intensificada pela fragilidade socioeconômica de suas populações. Este binômio pobreza-DC é típico de todas as DTN, no qual a doença intensifica o quadro de fragilidade, e esta possibilita, ainda mais, a contaminação dos indivíduos.

O tratamento da DC conta, como mencionado anteriormente, com benznidazol e nifurtímox (Figura 3). São compostos pouco ativos na fase crônica da DC e apresentam eventos adversos importantes, que causam grande perda na qualidade de vida do paciente. Mostra-se, assim, a necessidade da pesquisa por novas opções terapêuticas curativas para a DC, especialmente para a fase crônica da parasitose.

O NFOH, um intermediário de síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina, é um potencial antichagásico ativo em modelos celulares e animais da DC crônica. Estudos pré-clínicos de mutagênese e farmacocinética mostraram sua segurança. Fármacos dirigidos e pró-fármacos dendriméricos já foram e são bem-sucedidos na pesquisa por novos agentes antineoplásicos mais seguros. A afinidade molecular do tecido doente pelos primeiros e a adequação farmacocinética e entrega em massa de agentes quimioterápicos dos segundos são ferramentas, então, muito úteis na pesquisa por opções terapêuticas para a DC.

O RMM, receptor responsável pelo reconhecimento de compostos endógenos e exógenos, é um importante alvo estudado para o direcionamento de compostos quimioterápicos. Apesar de sua estrutura tridimensional não ser conhecida, sua alta afinidade por compostos manossilados é uma costumeira estratégia no direcionamento de fármacos em doenças onde os macrófagos atuam ativamente. O uso deste transportador

em modelos de leishmaniose, doença causada por um agente etiológico geneticamente próximo do *T. cruzi*, leva ao aumento da concentração de fármacos quimioterápicos em sítios infectados com alto infiltrado de macrófagos – similar à DC. Por este motivo, foi escolhido como alvo no planejamento de novos compostos antichagásicos.

## 2.1 Objetivos gerais

Neste trabalho propôs-se, em face aos problemas e potenciais soluções apresentadas, a síntese, caracterização estrutural, físico-química e por modelagem molecular de fármacos dirigidos de NFOH. Estes compostos são formados através da ligação de manose e do composto bioativo a um dendron triazólico, sintetizado através de *click chemistry*. Tal açúcar é um excelente quimiodiretor para tecidos altamente infiltrados, e a presença de macrófagos é típica na fase crônica da DC. O dendron planejado é capaz de ser polimansilado ou conter mais de uma molécula de NFOH, pois apresenta em sua superfície nove hidroxilas livres herdadas do composto base, o trometamol; para uma tomada de decisão mais acertada, a modelagem molecular também foi explorada. A biologia estrutural do alvo molecular do fármaco dirigido, o RMM, foi estudado para melhor entendimento de suas propriedades fisiológicas e relação com o pH lisossômico, e culmina num estudo de farmacodinâmica do composto planejado e seu alvo.

Originalmente, propôs-se a síntese, caracterização físico-química e estrutural do composto citado, bem como propriedades farmacocinéticas e estudos de atividade biológica. Com a pandemia, a atividade presencial dos laboratórios foi suspensa até o fim de 2021. A inclusão da parte de modelagem molecular foi realizada, pois pôde ser realizada com a exposição limitada exigida. Com a retomada das atividades laboratoriais, a síntese e caracterizações puderam ser, parcialmente, estudadas, mas com tempo limitado para os demais estudos.

## 2.1. Objetivos específicos

### 2.1.1 Síntese, caracterização estrutural e físico-química e modelagem molecular do dendron dirigido de hidroximetilnitrofurural (NFOH)

Realizaram-se, apenas, os itens com \*

\*Síntese de dendron triazólico poli-hidroxilado, cujo material de partida principal é o trometamol;

\*Acetilação e bromação do sacarídeo para posterior ligação ao dendron.

Não foi possível realizar os itens que seguem:

- Síntese e ligação do NFOH ao dendron manosilado;
- Caracterização estrutural do produto e seus intermediários de síntese, com uso de RMN, IV, ponto de fusão e CCD;
- Caracterização físico-química do produto e seus intermediários de síntese, com uso de HPLC sob diferentes pH.

### 2.1.2 Estudo da estrutura e função do receptor de manose de macrófagos (RMM) à luz da modelagem molecular

Realizaram-se, apenas, os itens com \*

\*Estudo e caracterização da biologia estrutural do domínio principal do RMM, de suas estruturas primárias, secundárias e terciárias;

\*Estudo e simulação da conformação do domínio principal RMM em pH extracelular e pH lisossômico, para entendimento da dinâmica de liberação de ligantes para digestão;

\*Simulação da interação manose-RMM, oligossacarídeos-RMM.

**Este estudo faz parte do artigo** Lucas Adriano do Nascimento, Glaucio Monteiro Ferreira and Elizabeth Igne Ferreira: *Exploring the conformational dynamics of the CDR4: A model for receptor lysosomal activity shifts in search of 'sweet' and 'sour' states.*

Não foi possível realizar o item que segue:

- Simulação de interação e fármacos dirigidos-RMM, para entendimento dos requisitos estruturais para a formação de um complexo ativo.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Estudo da síntese, caracterização estrutural e físico-química do dendron manossilado

##### 3.1.1. Material e Métodos

###### 3.1.1.1 Reagentes, solventes e catalisadores

Acetato de etila, acetato de mercúrio ( $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ ), acetato de sódio, acetonitrila, ácido bromídrico, ácido trifluoroacético (TFA), água ( $\text{H}_2\text{O}$ ), álcool propargílico, anidrido acético, anidrido trifílico ( $\text{Tf}_2\text{O}$ ), azida sódica, brometo de propargila, carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$  (s)), cloroformato de *p*-nitrofenila, clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), diclorometano ( $\text{CHCl}_2$ ), dimetilformamida (DMF), di-*tert*-butilcarbonato (BOC), D-manose, formaldeído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), hidróxido de potássio ( $\text{KOH}$  (s)), iodeto de cobre, metanol (MeOH), nitrofural (NF), piridina, *tert*-butanol, tetraidrofurano (THF), trietilamina (TEA), trometamol (Tris).

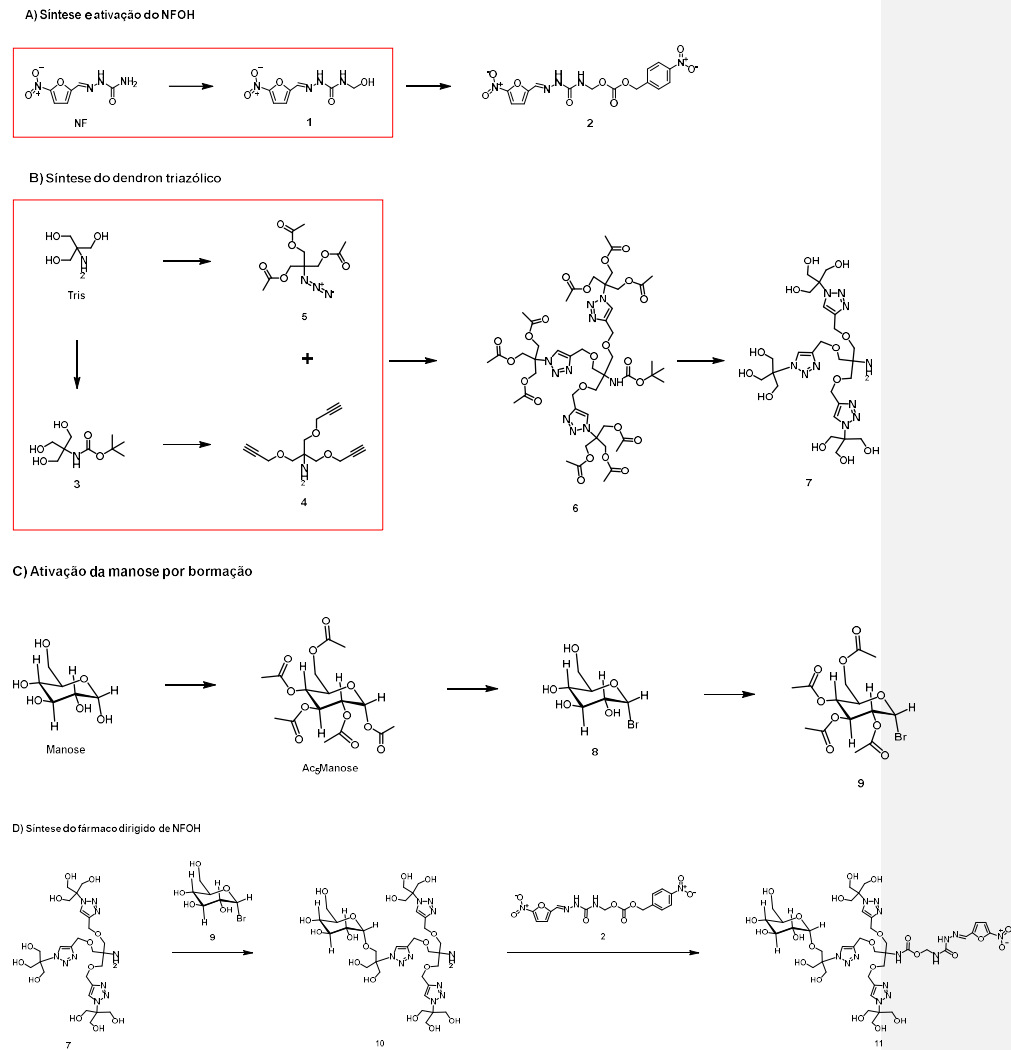
###### 3.1.1.2 Equipamentos

- Agitadores magnéticos;
- Aparelho digital capilar Büchi M-565;
- Câmara de fotoestabilidade Farma 424 CF Nova Ética;
- Cromatógrafo Biotage Isolera Prime;
- Espectrofotômetro FTIR IRAffinity-1 Shmadzu;
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker 300 MHz, modelo Advanced DPX-300;
- Rotaevaporador Büchi

### 3.1.1.3 Método de síntese

#### 3.1.1.3.1 Planejamento sintético

**Figura 25** – Rota sintética para produção do dendron dirigido de NFOH.



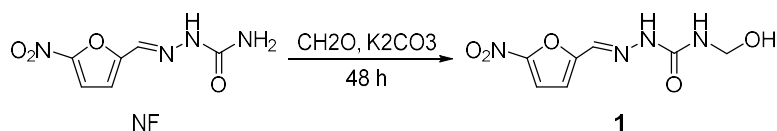
Os quadros contornados em vermelho correspondem às etapas realizadas. Fonte: Produção do autor.



### 3.1.1.3 Síntese e ativação do NFOH

#### 3.1.1.3.1 Síntese do NFOH (CHUNG, 1996)

Figura 26 – Síntese do NFOH.

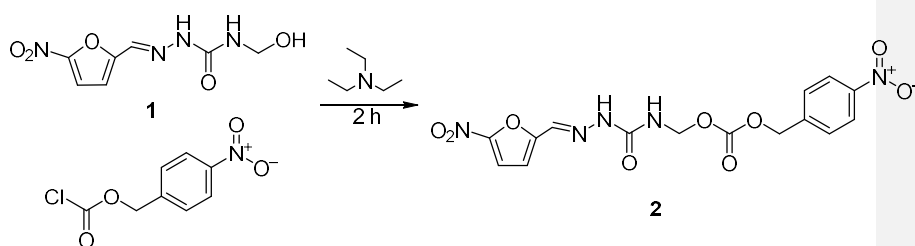


Fonte: Produção do autor.

Em 10 mL de H<sub>2</sub>O adicionam-se, em duas porções iguais de NF (0,990 g, 5 mmol, 1 eq.), gotejadas com 4 horas de diferença, e CH<sub>2</sub>O (0,540 g, 18 mmol, 2,5 eq.) em presença de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A reação é mantida por 48 h à temperatura ambiente e sob agitação, acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD) (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:AcOH, 85:10:5 v/v/v). Em seguida, o excesso de CH<sub>2</sub>O deve ser retirado após a filtração do produto com diversas lavagens com MeOH. Rendimento de 72,6%.

#### 3.1.1.3.2 Ativação do NFOH (adaptado de KOSTOVA et al., 2015)

Figura 27 – Ativação do NFOH para obtenção de 2.



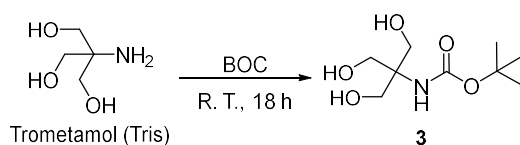
Fonte: Produção do autor.

Dissolve-se cloroformato de *p*-nitrofenila (2,155 g, 10 mmol, 1 eq.) em 10 mL de tetraidrofurano. A essa solução adiciona-se NFOH (2,282 mg, 10 mmol, 1 eq.) de trietilamina (0,7 mL, 10 mmol, 1 eq.). A mistura é agitada durante 2 h e o precipitado então formado é filtrado e secado sob pressão reduzida. O resíduo obtido é suspenso em 50 mL de acetato de etila e água. A fase orgânica é, então, extraída ao menos três vezes com 50 mL água e ao menos três com 50 mL de solução saturada de cloreto de sódio, e então secada com sulfato de magnésio. Retira-se o solvente sob pressão reduzida e o resíduo é triturado com 10 mL de diclorometano. O precipitado formado é finalmente separado por filtração.

### 3.1.1.4 Síntese do dendron e funcionalização com D-manose

#### 3.1.1.4.1 Síntese do intermediário 1 (*Tris*BOC) (CHABRE et al., 2008)

**Figura 28** – Proteção do Tris com BOC para produção de **3**.

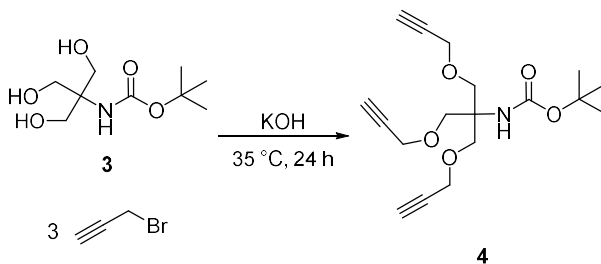


Fonte: Produção do autor.

Uma solução di-*tert*-butilcarbonato (BOC) (2,335 g, 10,7 mmol, 1,3 eq) em 10 mL de *tert*-butanol é adicionada a uma suspensão de trometamol (Tris) (0,993 g, 8,20 mmol, 1 eq.) em 15 mL de metanol e *tert*-butanol (1:1 v/v). A reação é mantida à temperatura ambiente, sob agitação por 18 h. Ao fim dela, o solvente é removido por pressão reduzida e o produto é extraído por precipitação do resíduo em acetato de etila gelado e, então, filtrado sob pressão reduzida para a remoção do excesso do solvente. Rendimento de 76%.

#### 3.1.1.4.2 Síntese do intermediário 2 (*Prop*<sub>3</sub>*Tris*BOC) (CHABRE et al., 2008)

**Figura 29** – Propargilação do TrisBOC para obtenção de **4**



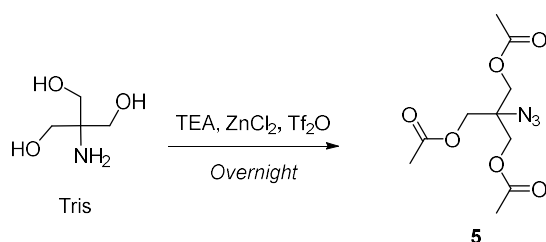
Fonte: Produção do autor.

A 15 mL de DMF anidro a 0 °C adicionam-se TrisBOC (0,500 g, 2,26 mmol, 1 eq.) e brometo de propargila (1,2 mL, 13,6 mmol, 6 eq.), além de KOH (0,763 g, 13,6 mmol, 6 eq.) como catalisador, mantida assim por 15 minutos. A solução é, então, aquecida a 35 °C e mantida nessa temperatura sob agitação e atmosfera inerte por 24 h. Após a reação, o produto é filtrado e colocado em funil de separação junto a 50 mL de

acetato de etila, realizando lavagens com 30 mL de água ao menos três vezes. A fase orgânica é separada e a adiciona-se sulfato de sódio anidro, seguido de uma filtração e remoção do solvente sob pressão reduzida a 50 °C. A purificação do produto é realizada por cromatografia em coluna. Rendimento de 30%.

#### 3.1.1.4.3 Síntese do intermediário 3 ( $\text{Ac}_3\text{TrisN}_3$ ) (RAZGULIN, MECOZZI, 2015)

**Figura 30** – Síntese da azida de trometamol triacetilado para a obtenção de **5**.

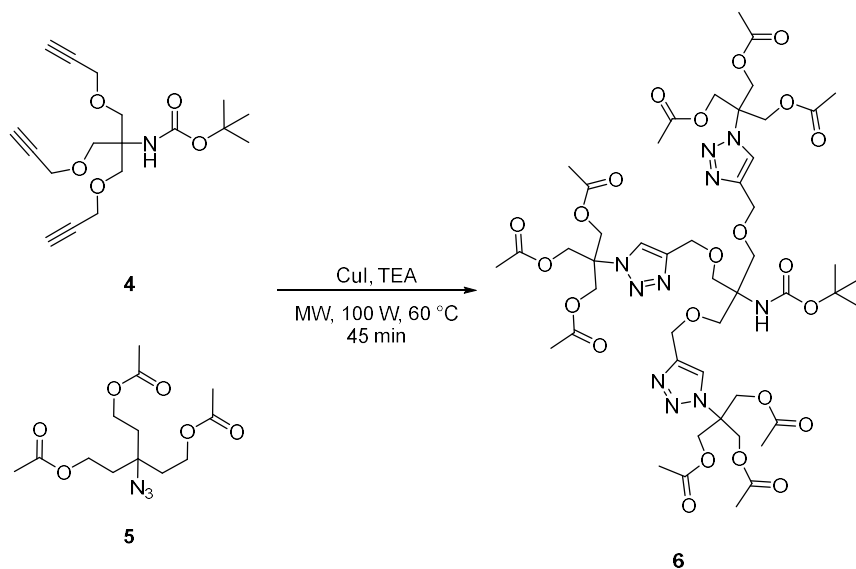


Fonte: Produção do autor.

Em balão de fundo redondo A, contendo 65 mL de diclorometano:metanol:água (3:10:3 v/v/v), adicionam-se Tris (1,000 g, 8,26 mmol, 1 eq.) e trietilamina (2,8 mL, 21,5 mmol, 2,6 eq.), além de 0,403 mmol de cloreto de zinco (0,055 g, 0,403 mmol, 0,05 eq) como catalisador. Em um balão de fundo redondo B, contendo 20 mL de diclorometano:água (1/1 v/v) é dissolvida, em banho de gelo a 0 °C, azida sódica (2,717 g, 41,8 mmol, 5,1 eq.), seguida da adição gota a gota anidrido trifílico (20,8 mL, 123 mmol, 15 eq.), mantidos sob agitação por 2 h nessas condições; após a separação da fase orgânica, a fase aquosa é extraída com pequenas porções de diclorometano. Esta fase orgânica é então adicionada ao balão A, que permanece sob agitação *overnight*. Retira-se o solvente por pressão reduzida e a ele adicionam-se 28,9 mmol de acetato de sódio em 50 mL de anidrido acético. Esta reação é aquecida a 140 °C e então resfriada; o excesso de solvente é removido sob pressão reduzida e o resíduo extraído ao menos quatro vezes com diclorometano e solução de bicarbonato de sódio. A fase orgânica é separada e a ela adiciona-se sulfato de sódio, sendo filtrada sob pressão reduzida e concentrada sob pressão reduzida.

### 3.1.1.4.4 Síntese do intermediário 4 (Ac<sub>9</sub>DendronBOC) (YOO et al., 2007)

**Figura 31** – Síntese do dendron protegido 6.

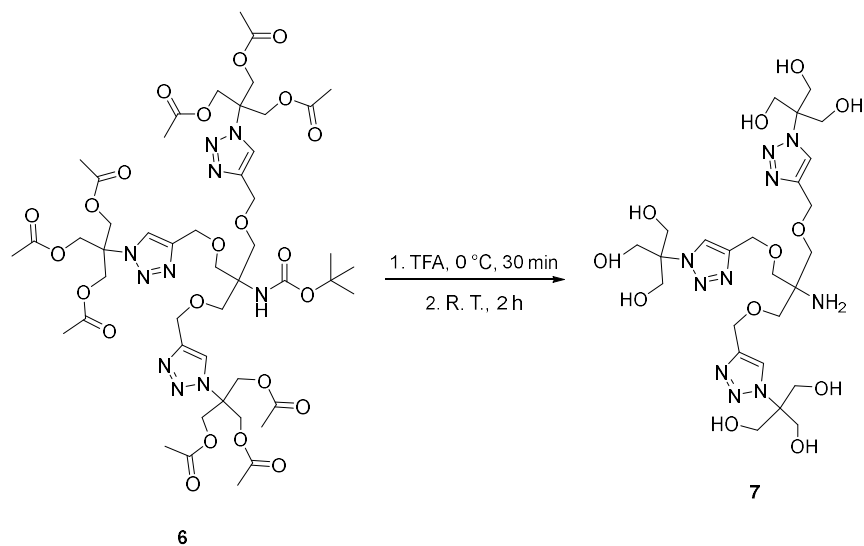


Fonte: Produção do autor.

A 3,0 mL de água:tetraidrofurano (1:1 v/v) adicionam-se 4 (0,034 g, 0,010 mmol, 1 eq), 5 (0,013 g, 0,040 mmol, 4 eq.), iodeto de cobre (0,002 g, 0,010 mmol, 1 eq.) e, gota a gota, de trietilamina (1,6 mL, 0,012 mol, 1000 eq). A reação é submetida a micro-ondas a 100 W de potência e 100 °C por 45 minutos. Ao fim dela, adicionam-se 15 mL de acetato de etila; a solução é, então, lavada ao menos duas vezes com 10 mL de solução saturada de cloreto de amônio e ao menos uma com solução saturada de cloreto de sódio. A fase orgânica é separada e a ela adiciona-se sulfato de sódio, sendo filtrada e concentrada sob pressão reduzida.

### 3.1.1.4.5 Síntese do intermediário 5 (Dendron) (CHABRE et al., 2008)

Figura 32 – Desproteção do dendron para obtenção de 7.

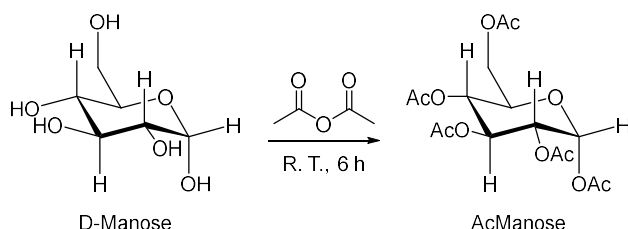


Fonte: Produção do autor.

Uma solução de 3,5 mL de diclorometano anidro contendo 6 (1,125 g, 1 mmol, 1 eq.) é mantida sob agitação em banho de gelo a 0 °C e a ela adicionam-se, gota a gota, ácido trifluoracético (1,5 mL, 19,25 mmol, 19 eq.). Esta solução é assim mantida por 30 minutos; após este período, é mantida sob agitação e temperatura ambiente por 2 h. O meio por fim é concentrado sob pressão reduzida utilizando-se tolueno como co-solvente.

### 3.1.1.4.6 Síntese do intermediário 7 (AcOManose) (WOLFROM, THOMPSON, 1963)

**Figura 33** – Acetilação da manose.

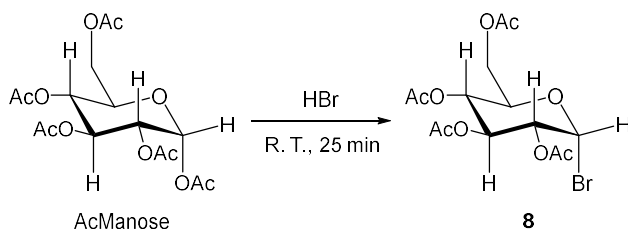


Fonte: Produção do autor.

Em um balão de fundo redondo, adiciona-se piridina anidra (65 g, 66,2 mL, 0,82 mol, 16 eq.) a anidrido acético (46,3 mL, 0,48 mol, 8 eq.); esta mistura é então resfriada com 0 °C, seguida da adição de 55 mmol de D-manose (9,909 g, 55 mmol, 1 eq.). Esta suspensão é então mantida 6 h a temperatura ambiente, e ao fim deste período, 200 mL de água gelada adicionam-se. O produto cristaliza em banho de gelo, e então é recristalizado consecutivamente com etanol a quente.

### 3.1.1.4.7 Síntese do intermediário 8 (AcManoseBr) (TALLEY, REYNOLD, EVANS, 1943)

**Figura 34** – Bromação da manose acetilada para obtenção de **8**.



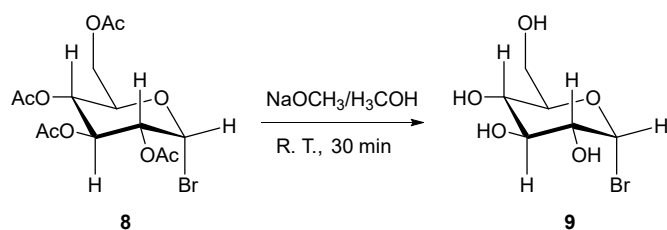
Fonte: Produção do autor.

Em um balão de fundo redondo com 2,56 mmol de AcManose (0,999 g, 2,56 mmol, 1 eq.) foram adicionados 3,0 mL de solução de ácido bromídrico (33%) em ácido acético glacial. A reação é mantida sob agitação e a temperatura ambiente por 25 minutos acompanhada de CCD. Após o término, a mistura é diluída em clorofórmio e submetida às seguintes extrações: 2x água desionizada; 2x solução saturada de bicarbonato de sódio;

2x novamente de água desionizada. A fase orgânica é, então, separada e a ela adiciona-se sulfato de sódio anidro; por fim, é filtrada e concentrada sob pressão reduzida.

#### 3.1.1.4.8 Síntese do intermediário 9 (ManoseBr) (REN et al., 2015)

**Figura 35** – Desacetilação da manose bromada para obtenção de 9.

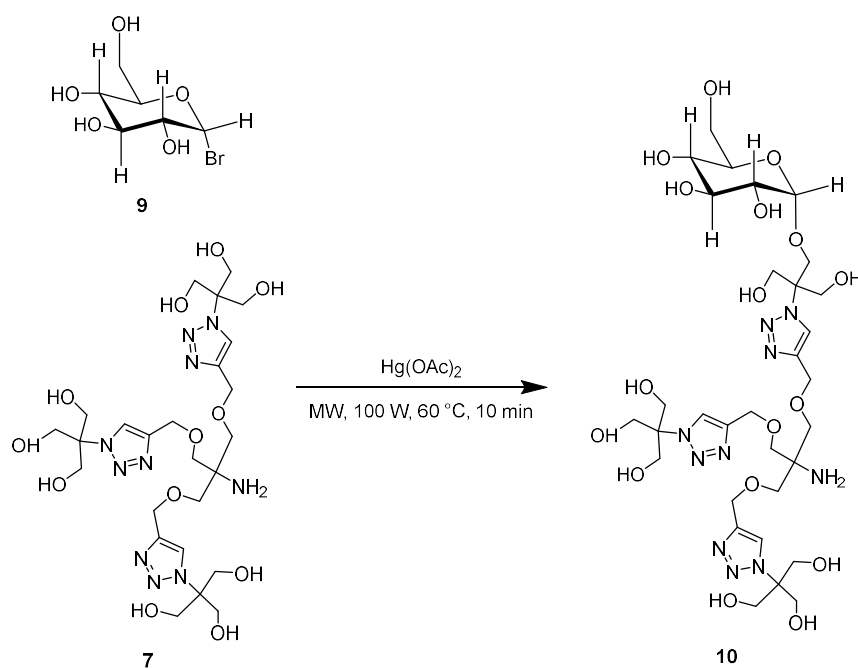


Fonte: Produção do autor.

A 20 mmol de 9 (8,224 g, 20 mmol, 1 eq) em 10 mL de metanol anidro, adiciona-se metóxido de sódio (0,216 g, 4 mmol, 0,2 eq.) ou hidróxido de sódio. Mantém-se a reação por 4 horas sob agitação magnética, e, após esse período, o produto é neutralizado por troca iônica com o uso de resina ácida DOWEX<sup>+</sup> filtrado e concentrado sob pressão reduzida.

3.1.1.4.9 Funcionalização do dendron (adaptado de HORISBERGER, LEWIS, SMITH, 1972)

Figura 36 – Funcionalização da manose para obtenção de 10



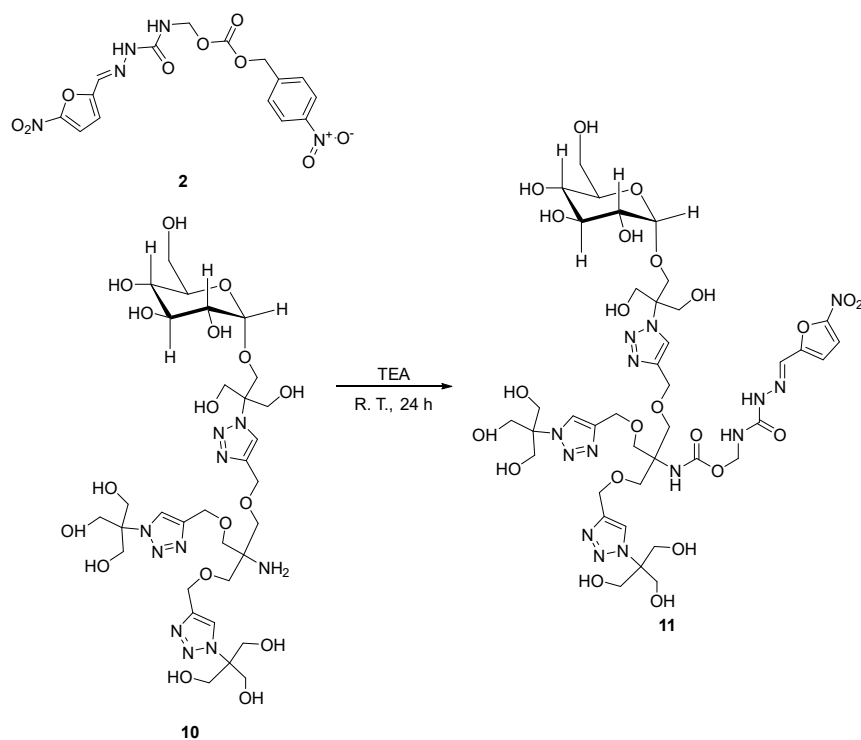
Fonte: Produção do autor.

Adiciona-se 1,0 mmol de **7** (0,767 g, 1 mmol, 1 eq.) e acetato de mercúrio (0,956 g, 3 mmol, 3 eq.) a uma solução de **9** (1,215 g, 5 mmol, 5 eq.), em 10 mL de acetonitrila. Esta mistura é submetida a micro-ondas a 100 W de potência e a 60 °C por 10 minutos. Após resfriada, a solução é extraída com água e então adiciona-se sulfato de sódio, sendo então filtrada e reduzida. O produto bruto obtido é então separado por cromatografia em coluna e a mistura de isômeros recristalizada em etanol a quente.



### 3.1.1.5 Síntese do fármaco dirigido de NFOH (adaptado de KOSTOVA et al., 2015)

Figura 37 – Síntese do fármaco dirigido de NFOH



Fonte: Produção do autor.

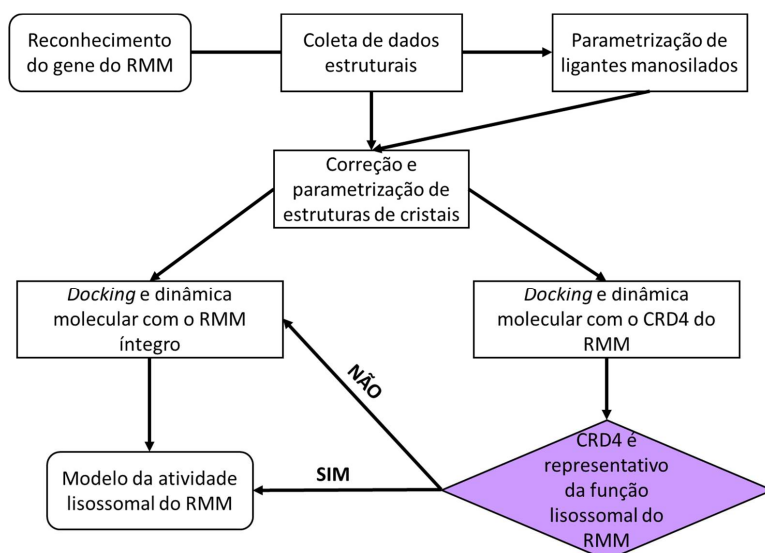
A uma solução de 10 mL de DMF contendo **10** (3,892 g, 4,64 mmol, 2 eq.), adiciona-se, gota a gota, trietilamina (1,3 mL, 0,009 mol, 4 eq.), seguido de **2** (0,944 g, 2,32 mol, 1 eq); esta mistura, então, é mantida por 24 h sob agitação e temperatura ambiente. Ao fim da reação, adicionam-se 40 mL de acetato de etila e realizam-se ao menos três extrações com 30 mL de água. A fase orgânica é então separada e a ela adiciona-se sulfato de sódio, sendo filtrada e tendo seu solvente removido por pressão reduzida. O produto de interesse é isolado através de uma cromatografia em coluna.

### **3.2 Estudo da estrutura e função do receptor de manose de macrófagos (RMM) sob luz da modelagem molecular**

Através da modelagem molecular, especialmente com o uso de simulações de dinâmica molecular (*molecular dynamics*, MDs), é possível compreender fenômenos moleculares envolvendo uma ou mais macromoléculas através da observação da mobilização de diferentes átomos presentes nesses sistemas e como se comportam em relação aos demais. Com tais ferramentas, a investigação de fenômenos regulatórios, metabólicos e de sinalização se torna bastante facilitada, especialmente hoje com a grande disponibilidade de algoritmos de mecânica molecular e quântica disponíveis para a construção de sistemas multiatômicos (AMINPOUR; MONTEMAGNO; TUSZYNSKI, 2019).

Parte da proposta deste trabalho teve como objetivo investigar os fenômenos de ligamento e desligamento do RMM, especialmente da porção CRD-4, de seus ligantes e sua relação com a mudança de pH. Com tais resultados, foi possível aumentar o entendimento sobre o funcionamento do receptor de manose, sua relação com o pH e a complexação de cátions divalentes, além do comportamento do receptor frente a diferentes ligantes manosilados. Tais resultados serão úteis para pesquisa de inibidores do RMM para o tratamento de doenças que são parte do desequilíbrio fisiológico instaurado, também em grupos transportadores que sejam ainda mais captados por este receptor. A Figura 24 representa, esquematicamente, o que foi efetuado em modelagem molecular.

**Figura 24** – Plano do trabalho de modelagem molecular realizado.



Fonte: Produção do autor.

### 3.2.1. Material e métodos

#### 3.2.1.1 Material

- AutoDock Vina (TROTT, OLSON, 2010);
- AutoDockTools 1.5.6 (MORRIS et al., 2009);
- ChemDraw 20.1.1 (PerkinElmer);
- Desmond 2021-4 (Schrödinger Inc., BOWERS et al., 2006);
- GROMACS (BEKKER et al., 1993; ABRAHAM et al., 2015);
- LigParGen (DODDA et al., 2017a, 2017b; JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 2005);
- Modeller 10.2 (WEBB, SALI, 2016);
- ProPka 3.4 (OLSSON et al., 2011; SØNDERGAARD et al., 2011);
- PyMol 2.5.2 (Schrödinger Inc.);
- Spartan '14 1.1.4 (WaveFunction, Inc);
- SYBYL-X 2.0 (Tripos, Inc);

### **3.2.1.2 Métodos**

#### **3.2.1.2.1. Tratamento dos arquivos para procedimentos computacionais**

As proteínas utilizadas foram recolhidas do Protein DataBank (PDB: 7L64, Feinberg et al., 2021) no formato .pdb, e foram reconstruídas com auxílio do *software* Modeller 10.2, para remoção de erros inerentes da técnica de cristalografia, bem como remoção de eventuais vetores de expressão e mutações pontuais efetuadas na sequência de resíduos. A sequência dos resíduos que as compõem foi obtida através do servidor UniProt e alinhada exclusivamente às proteínas cristalografadas, para manutenção de seus corretos enovelamentos. As estruturas obtidas foram aceitas caso o RMSD comparado às cristalografias fosse inferior a 2 Å. A estrutura do receptor completo, contudo, foi retirada do servidor AlphaFold, sendo desnecessárias demais correções.

As proteínas foram analisadas no programa Sybyl-X e, através do módulo Bio, foi feita a correção de átomos com nomes incoerentes, correção da protonação e cargas dos resíduos em pH = 7,2 e pH = 4,5 (com auxílio do módulo em Python ProPka 3.4 (OLSSON et al., 2011; SØNDERGAARD et al., 2011)), solução de choques estéricos entre resíduos e minimização de energia. A estrutura final obtida foi comparada à estrutura cristalografada através do RMSD.

Os ligantes manossilados foram desenhados no *software* ChemDraw 10.1 (PerkinElmer Inc.) e convertidos em arquivos .mol2. As estruturas foram individualmente minimizadas pelo *software* Spartan 14 (Wavefunction Inc.) sob o método semiempírico PM3. Estas, então, foram parametrizadas sob o campo de força OPLS-AA pelo *webserver* LigParGen (JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 2005; DODDA et al., 2017a, 2017b), podendo ser utilizadas para demais experimentos computacionais.

#### **3.2.1.2.2 Dinâmica molecular com a porção CRD-4 do RMM**

Através do módulo Desmond (Schrodinger Inc.), diferentes sistemas contendo a proteína do CRD4 foram simulados. Estes foram construídos sob o campo de força OPLS-2005 (BANKS et al., 2005), foram centralizados em caixas cúbicas contendo 13 Å de distância de todo e qualquer átomo da proteína, tratadas sob condições de fronteiras periódicas, e povoados com moléculas de água de modelo TIP3P (JORGENSEN et al., 1983) e contraíons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> para neutralização da carga total do sistema. Interações coulombianas de pequenas distâncias foram calculadas usando passos de 2 fs e limitadas a 9 Å, enquanto interações coulombianas de grandes distâncias foram estimadas segundo

Comentado [HAF4]: ?????

o método de partícula-malha de Ewald (PME). As simulações desses sistemas foram conduzidas em réplicas de 200 ns, totalizando 1  $\mu$ s de simulação de cada.

#### 3.2.1.2.3 Atracamento molecular de compostos uni- e poli-manosilados com o RMM

A estrutura dos receptores foi convertida ao formato .pdbqt de proteína *rígida* com uso do *software* AutoDock Tools 1.5.6. Os ligantes foram convertidos pelo mesmo método, mantidas flexíveis todas as ligações simples. Através do *software* AutoDock Vina 4.2 (TROTT, OLSON, 2010), o atracamento de todos os ligantes foi feito sob caixa de 10 Å em torno das coordenadas do  $\text{Ca}^{2+}$  I principal, com exaustão máxima do algoritmo.

As poses geradas, naturalmente ranqueadas pelo algoritmo por afinidade do complexo, foram, individualmente, analisadas com auxílio do visualizador PyMol 2.5.5 (Schrodinger Inc.), com respeito ao posicionamento das hidroxilas 3 e 4 das extremidades manosiladas em relação ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Apenas aquelas em que as hidroxilas interagiram integralmente com o complexo metaloproteico foram consideradas.

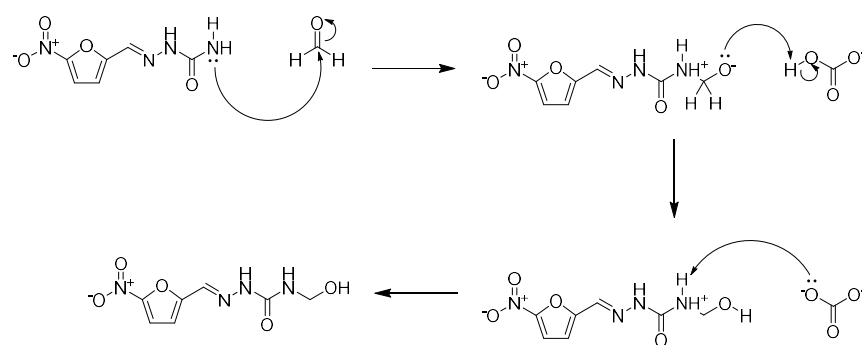
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese

A síntese deste dendron se dá pela ligação de dois produtos obtidos através do Tris, sendo um deles um derivado tri-*O*-propargílico do material de partida, e o outro uma azida. Em presença de cobre, estes grupos reagem para dar origem a um anel 1,2,3-triazólico bastante estável, e de fácil obtenção devido ao baixo tempo de reação sob microondas e pelo esperado alto rendimento reacional. Após a reação de *click chemistry*, o dendron pode ser ligado através de ligações lábeis em suas extremidades hidroxílicas e amínica – esta última proposta para a ligação com o NFOH.

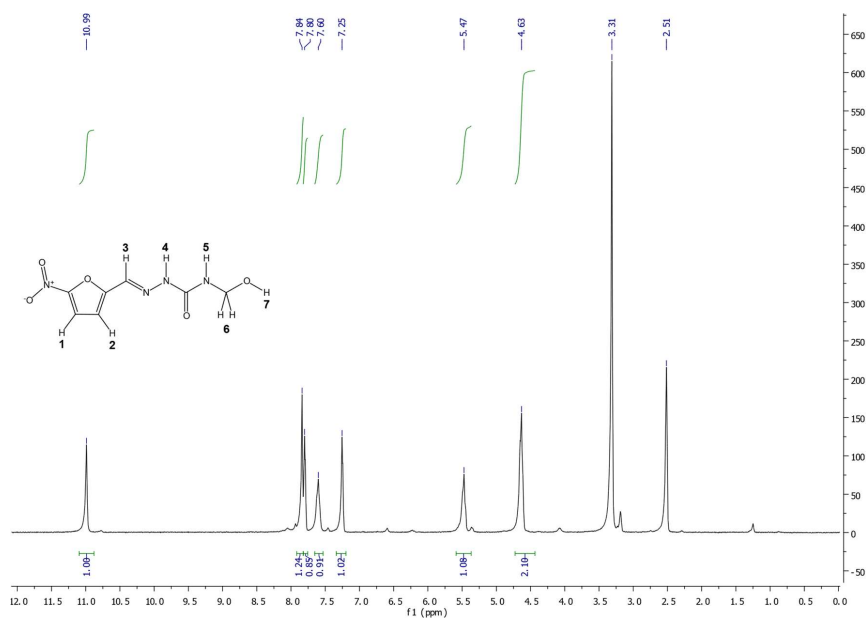
A síntese do NFOH (**1**) foi de fácil execução seguindo a metodologia proposta. Ao final da reação, um produto amarelo brilhante foi separado da solução de formaldeído, característico desta molécula. Através de uma adição nucleofílica, o NF é capaz de se ligar à carbonila do formaldeído com sua amida primária terminal, relativamente eletrofílica pelo efeito de ressonância com a vizinhança, sendo a transferência de prótons da reação mantida pelo equilíbrio ácido-base  $\text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^-$ . O mecanismo de reação é apresentado na Figura 25, bem como o RMN de  $^1\text{H}$  do produto purificado e secado na Figura 26.

**Figura 25** – Mecanismo de reação para a produção de **1**.



Fonte: Produção do autor.

**Figura 26** – RMN de  $^1\text{H}$  (DMSO- $\text{D}_6$ , 300 Hz,  $\delta$  = ppm) do produto **1**.



Fonte: Produção do autor.

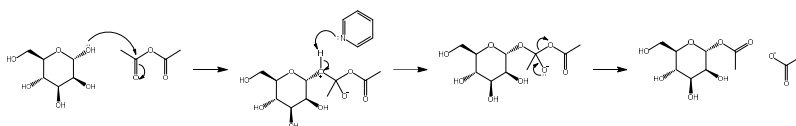
**Tabela 1** – Sinais do RMN de  $^1\text{H}$  respectivos do produto **1**.

Sinal (ppm)	$J$ (Hz)	Átomo
10,99	1,00	4 (NH)
7,84	1,24	3 (CH)
7,80	0,85	1 (CH)
7,60	0,91	5 (NH)
7,25	1,02	2 (CH)
5,47	1,08	7 (OH)
4,63	2,10	6 (CH <sub>2</sub> )
3,31	-	Água
2,511	-	Solvente (DMSO)

Fonte: Produção do autor.

A síntese do pentaacetato de manose foi proposta como opção na falta deste produto, já que é disponibilizado de forma comercial. Esta reação é bastante direta, uma vez que consiste basicamente em consecuentes adições nucleofílicas das hidroxilas manosídicas a carbonilas do anidrido acético, sendo a transferência de prótons intermediada pela piridina. O resfriamento inicial do sistema é necessário para impedir qualquer hidrólise do anidrido pela umidade ou por eventual água presente nele ou demais reagentes e solventes. O mecanismo de reação proposto é apresentado na Figura 27, bem como o RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do produto bruto nas Figuras 14 e 15. O pentaacetato de manose é importante para a bromação proposta em sequência, já que possui grupos de partida ( $\text{H}_3\text{COO}^-$ ) que facilitam substituições nucleofílicas.

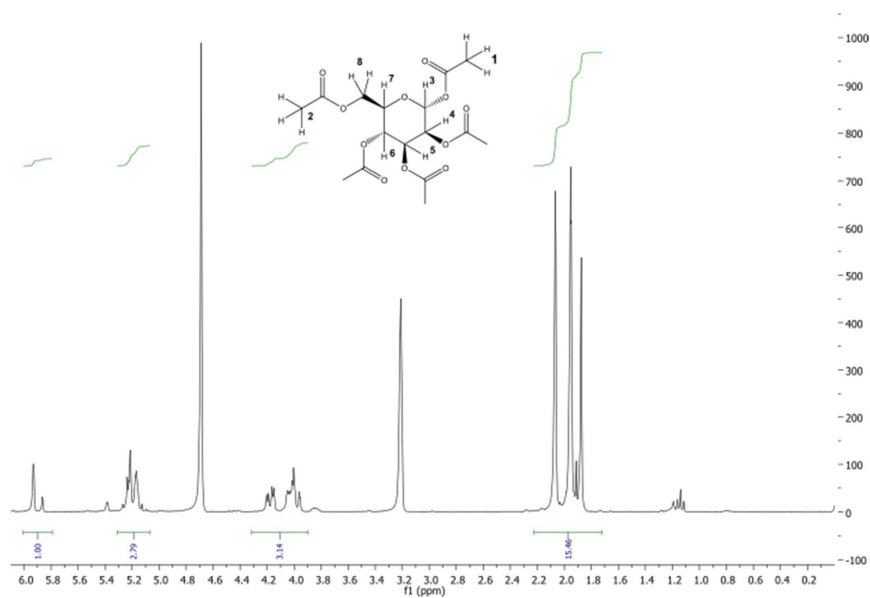
**Figura 27** – Síntese do  $\alpha$ -acetato de manose



Importante observar que o mecanismo de reação com todas as hidroxilas é o mesmo, até que as cinco se encontrem acetiladas. Fonte: Produção do autor.



**Figura 28** – RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 Hz,  $\delta = \text{ppm}$ ) do produto pentaacetato de manose.



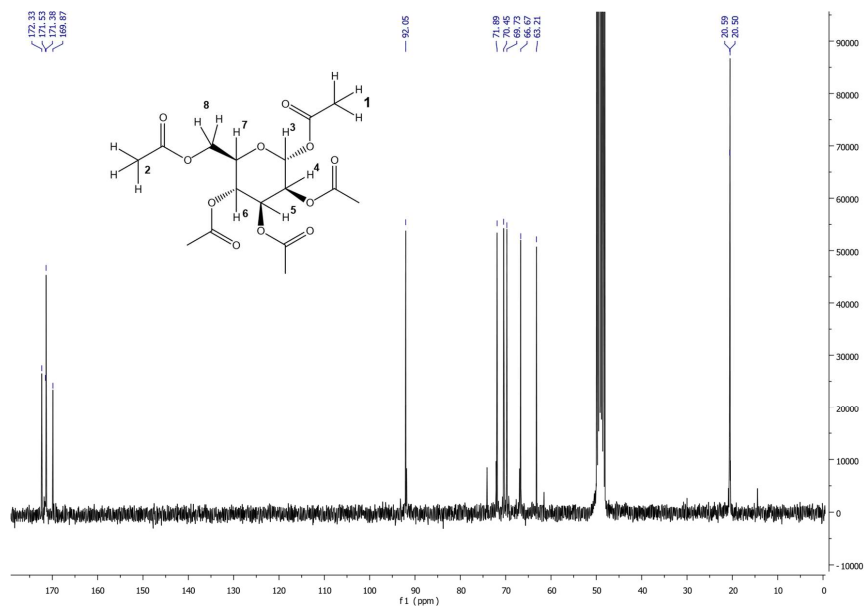
Fonte: Produção do autor.

**Tabela 2** – Sinais do RMN de  $^1\text{H}$  respectivos aos átomos do pentaacetato de manose.

Sinal (ppm)	$J$ (Hz)	Átomo
6,91	1,00	3 (CH)
5,18	2,79	4 (CH), 5 (CH) e 6 (CH)
4,68	-	Solvente ( $\text{CHCl}_3$ )
4,13	3,14	7 (CH) e 8 ( $\text{CH}_2$ )
3,28	-	Água
1,95	15,46	1 ( $\text{CH}_3$ ) e 2 ( $\text{CH}_3$ )

Fonte: Produção do autor.

**Figura 29** – RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 Hz,  $\delta = \text{ppm}$ ) do produto pentaacetato de manose



Fonte: Produção do autor.

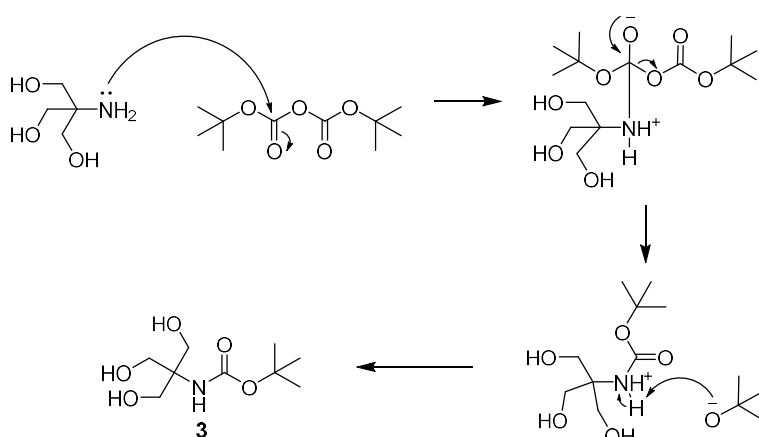
**Tabela 3** – Sinais do RMN de  $^{13}\text{C}$  respectivos aos átomos do pentaacetato de manose.

Sinal (ppm)	Átomo
172,33	
171,53	1 e 2 (C=O)
171,38	
169,87	
92,05	3
71,89	7
70,45	5
69,73	4
66,67	6
63,21	8
20,59	1 ( $\text{CH}_3$ )
20,55	2 ( $\text{CH}_3$ )

Fonte: Produção do autor.

A última etapa realizada da síntese, a proteção do Tris para obtenção do composto **3**, se dá através de adição nucleofílica sobre as carbonilas do BOC promovidas pelas hidroxilas presentes no trometamol, sendo a transferência de prótons garantida pelo equilíbrio ácido-base entre o solvente (*tert*-butanol) e sua base conjugada, que é liberada pela clivagem do BOC. O mecanismo de reação proposto se encontra na Figura 30. Esta é uma etapa importante para a diminuição de subprodutos originados de reação com a amina livre disponível no Tris, sendo necessária mascará-la com o BOC. Uma facilidade desta etapa reacional se dá na purificação do produto, que é feita por uma simples recristalização em acetato de etila frio. O produto é um cristal com aspecto de algodão, branco e opaco – diferente do material de partida, que é relativamente brilhante. Não foi possível realizar caracterização espectrométrica desta reação; contudo, já é recorrente no laboratório a produção do composto **3**.

**Figura 30** – Mecanismo de reação proposto para obtenção do produto **3**.



Fonte: Produção do autor.

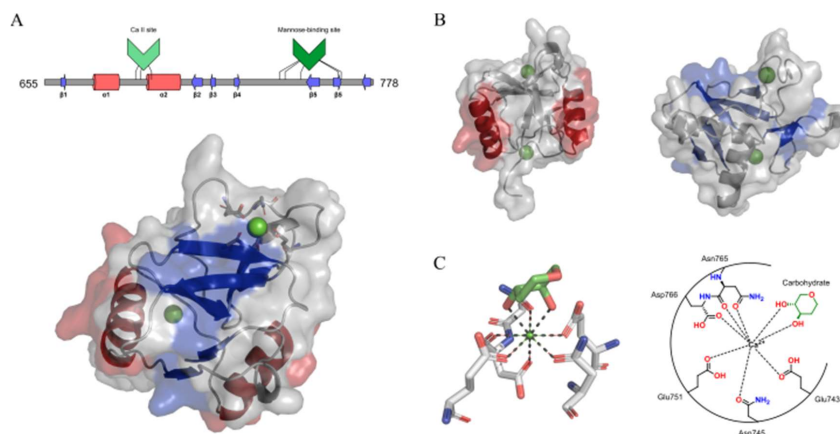
A rota sintética aqui planejada foi utilizada, anteriormente, para a obtenção do mesmo dendron triazólico, contudo para transporte de compostos dirigidos para a tripanotona redutase parasitária (NASCIMENTO, 2018; GONZAGA, 2023). Foi possível a obtenção, em ínfima quantidade, do composto **6**, que foi submetido a análise de RMN de  $^1\text{H}$  e apresentou sinais característicos de prótons heteroaromáticos. As demais tentativas para concentração do produto para prosseguimento com a síntese planejada, entretanto, não foram possíveis por problemas inesperados nas etapas iniciais,

especialmente na separação de produtos e subprodutos. Etapas específicas desta rota apresentaram problemas, dificultando ainda mais o prosseguimento da síntese. Dentre elas, a síntese do intermediário **5** não pôde ser realizada pela ausência de um dos reagentes, exigindo ao menos duas etapas adicionais com reações paralelas para sua obtenção. Tentou-se obter o intermediário **8**, mas a CCD não mostrou alterações por 24h, possivelmente pela qualidade do ácido bromídrico disponível.

## 4.2 Estudos de Modelagem Molecular

O CRD4 conta com duas  $\alpha$ -hélices e cinco folhas  $\beta$ -pregueadas, elementos de estruturas secundárias estáveis (EASE) consolidadas por diversas cristalografias (Figura 31). Algumas regiões de interesse podem ser destacadas para analisar a funcionalidade desta porção do RMM: o sítio de ancoramento do  $\text{Ca}^{2+}$  principal ( $\text{Ca}^{2+}$  I), o sítio estável de ligação com manose (*mannose-binding site*, MBS) (Figura 31C) e o sítio de ancoramento do  $\text{Ca}^{2+}$  auxiliar ( $\text{Ca}^{2+}$  II).

**Figura 31** – Caracterização estrutural do CRD4 e do MBS.



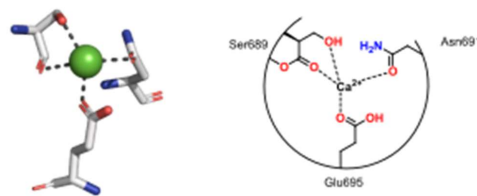
A – Sequência de resíduos e elementos de estrutura secundária estáveis do **CRD4** e visualização tridimensional do domínio, com destaque para as  $\alpha$ -hélices (vermelho) e as folhas  $\beta$ -pregueadas (azul); B – Destaque para os EASE; C – Representação bi- e tridimensional dos resíduos do MBS. Fonte: Produção do autor.

O íon  $\text{Ca}^{2+}$  I se encontra intimamente quelado aos resíduos Glu743, Asn745, Glu751, Asn765 e Asp766, que encapsulam o MBS. Este íon também se aproxima

**Comentado [HAF5]:** Ver número da figura, uma vez que vc cita 2 outras para o mecanismo

gentilmente da porção peptídica entre Asn765 e Asp766 (Figura 31C) O mesmo pode ser dito para o  $\text{Ca}^{2+}$  II, que também se encontra quelado aos resíduos Ser689, Asn691 e Glu695, interagindo também com a porção peptídica da asparagina (Figura 32). Ao passo que o  $\text{Ca}^{2+}$  I se encontra ligado ao CRD4 em todas as elucidações cristalográficas disponíveis (inclusive as estruturas não funcionais do receptor), o  $\text{Ca}^{2+}$  II aparece pontualmente presente em alguns complexos com ligantes, mas não parece ser essencial.

**Figura 32** – Interação entre o  $\text{Ca}^{2+}$  II e o CRD4.



Comentado [HAF6]: Ver o número da Figura

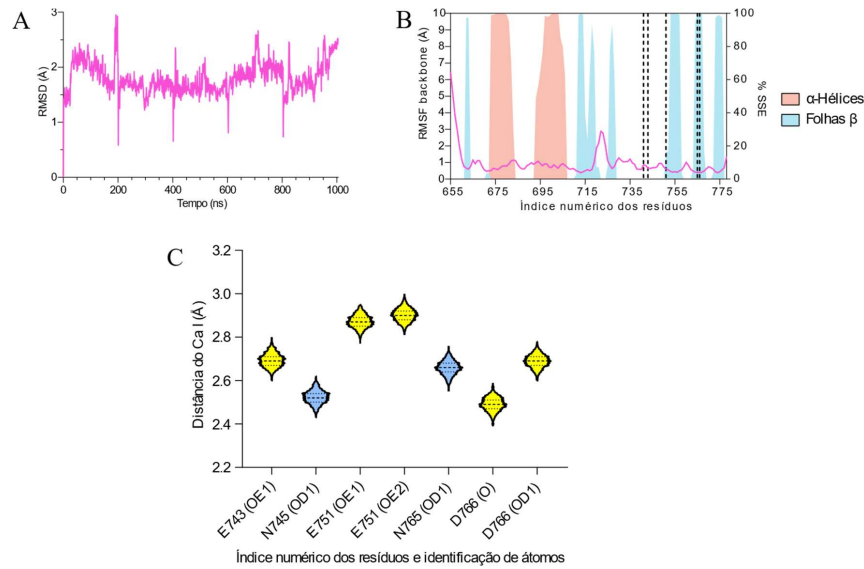
Fonte: Produção do autor.

Uma característica importante do CRD4 é a presença de uma longa volta, que se estende entre os resíduos 728 e 752, aproximadamente  $\frac{1}{4}$  do domínio inteiro. Nas primeiras cristalografias deste domínio feitas por Feinberg e colaboradores (2000), esta é a região que aparece desnaturada, impactando fundamentalmente a capacidade de interação com manose. As cristalografias mais recentes (FEINBERG et al., 2021) revelam a forma ativa desta volta, em que parte dos resíduos se intercala com as EESE; o foco, entretanto, fica nos três resíduos que compõem o MBS (Glu743, Asn745, Glu751, Figura 31C), que aparecem diretamente quelando o  $\text{Ca}^{2+}$  I. Neste trabalho, chamemos esta de “volta principal”.

A simulação de 1  $\mu\text{s}$  com a apoproteína do CRD4 demonstra alta estabilidade deste domínio (RMSD =  $1,80 \pm 0,29$  Å), com conservação das EESE em ao menos 80% de todo o tempo simulado. Além disso, os resíduos da MBS se encontram intimamente quelados ao  $\text{Ca}^{2+}$  I, explicitando a alta estabilidade deste sítio (Figura 33). O mesmo pode ser dito da apoproteína do CRD4 quando simulada em meio ácido sobre a preservação das EESE e do MBS (Figura 34).

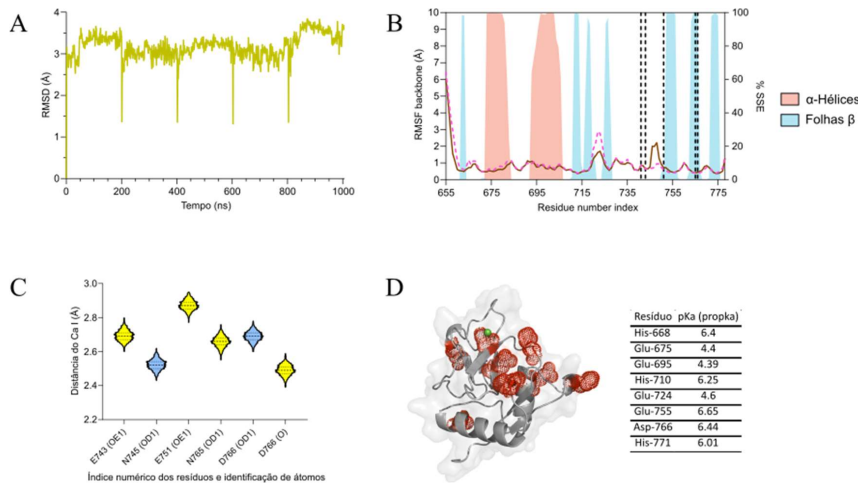
Comentado [HAF7]: Verificar o número da figura

**Figura 33** – Análise conformacional do sistema da apoproteína do CRD4 na conformação ativa



A – RMSD do *backbone* proteico durante as réplicas da simulação; B – RMSF e estabilização de estruturas secundárias no seguimento proteico; C – Distância entre os átomos dos resíduos do MBS e o  $\text{Ca}^{2+}$  I ao longo da simulação, sendo distâncias abaixo de 3,5 Å aceita como uma quelação. Fonte: Produção do autor.

**Figura 34** – Análise conformacional do sistema da apoproteína do CRD4 na conformação em meio ácido

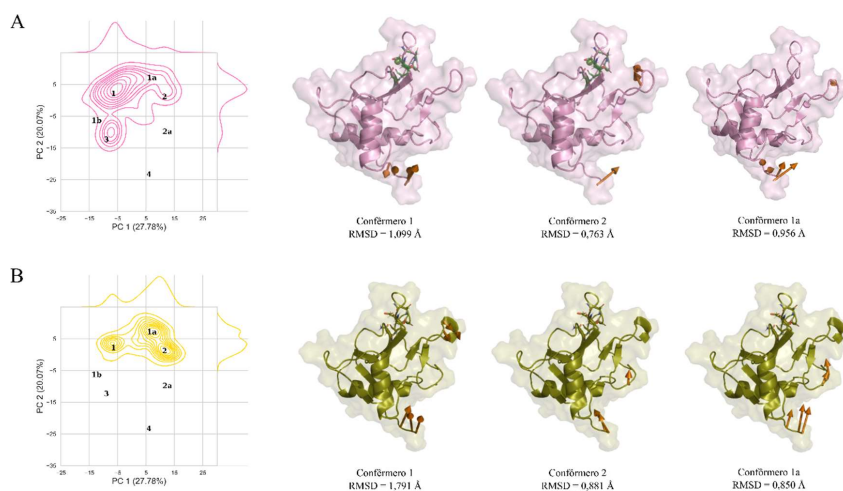


A – RMSD do *backbone* proteico durante as réplicas da simulação; B – RMSF e estabilização de estruturas secundárias no seguimento proteico (marrom) comparado à simulação da apoproteína (rosa pontilhado); C – Distância entre os átomos dos resíduos do MBS e o  $\text{Ca}^{2+}$  I ao longo da simulação, sendo distâncias abaixo de 3,5 Å aceita como uma quelação; D – Representação 3D do CRD4 com destaque vermelho para os resíduos protonados em meio ácido (pH = 4,5) e listagem deles e seus  $\text{pK}_a$  calculados. Fonte: Produção do autor.

Através da análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA) desses dois sistemas revela o mesmo perfil de movimentação do CRD4 nos dois pHs. Apesar de existente, o pouco movimento encontrado é confinado, em especial, às voltas N-terminal e em alguns trechos da volta principal, com pouco movimento nas demais voltas de ligação entre os EESE. O movimento, entretanto, não parece ser concertado às suas vizinhanças, já que os demais resíduos permanecem bastante estáticos em relação às posições originais do sistema. Apesar do sistema se mostrar menos flexível em meio ácido (RMSD =  $3,18 \pm 0,31$  Å) (Figura 34A), não há grandes diferenças conformacionais entre ele e o CRD4 em meio neutro (Figura 35). Desta forma, é de se concluir que a protonação de resíduos não acarreta alterações conformacionais importantes no domínio, mas possivelmente altera o perfil de interação deste com os demais domínios do RMM. Pela ausência de elucidação estrutural tridimensional do

receptor completo em qualquer meio, é difícil pontuar quais destas voltas podem estar envolvidas nesta alteração. Ainda é de se pontuar que o CRD4 apresenta alguns conformêros exclusivos ao meio neutro, com movimento entre os resíduos 719 e 726. Assim, é possível também que o confinamento conformacional proporcionado pelo meio ácido seja o responsável pela alteração conformacional do RMM.

**Figura 35** – PCA das simulações com o CRD4 em meio neutro (A) e em meio ácido (B)

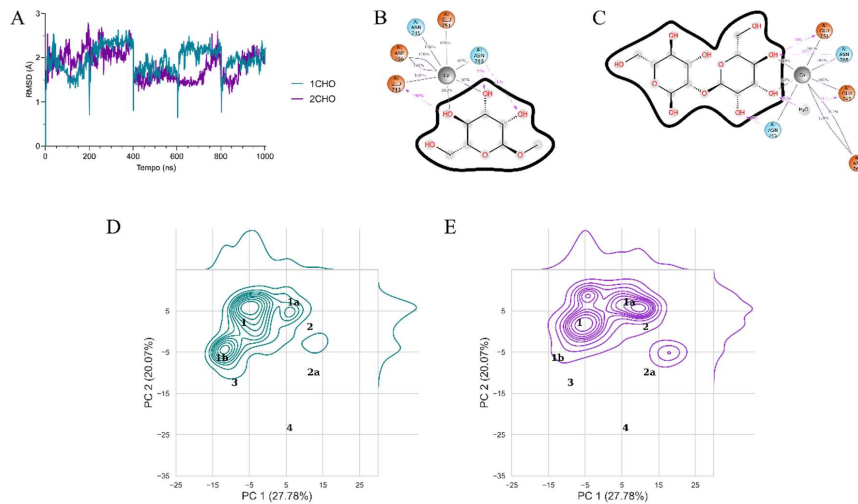


Junto são apresentados três conformêros representativos das distribuições apresentadas nos sistemas. Fonte: Produção do autor.

Quando simulado com ligantes, o comportamento é o mesmo dos demais sistemas (Figura 36). É interessante observar que o contato entre os sacarídeos e o CRD4 se dá única e exclusivamente através do  $\text{Ca}^{2+}$  I, que interage diretamente com as hidroxilas 3- e 4-OH do açúcar. Este resultado está de acordo com os resultados de cristalografias contendo diversos ligantes complexados ao domínio. É confortável reafirmar, então, que a estabilidade do complexo CRD4-manosídeos depende apenas da manutenção da conformação ativa dos resíduos do MBS, bem como da disponibilidade dos grupos doadores de densidade eletrônica para a quelação do  $\text{Ca}^{2+}$  I por parte do sacarídeo, sendo estes idealmente as hidroxilas supracitadas. A estereoquímica dos açúcares garante sua interação ideal com o MBS, como também ocorre com a fucose. As demais regiões do domínio não parecem ser impactadas de acordo com a PCA, que revela o mesmo perfil de movimento das simulações de apoestruturas.



**Figura 36** – Análise conformacional dos sistemas do CRD4 complexados com ligantes mono- e dimanosídicos



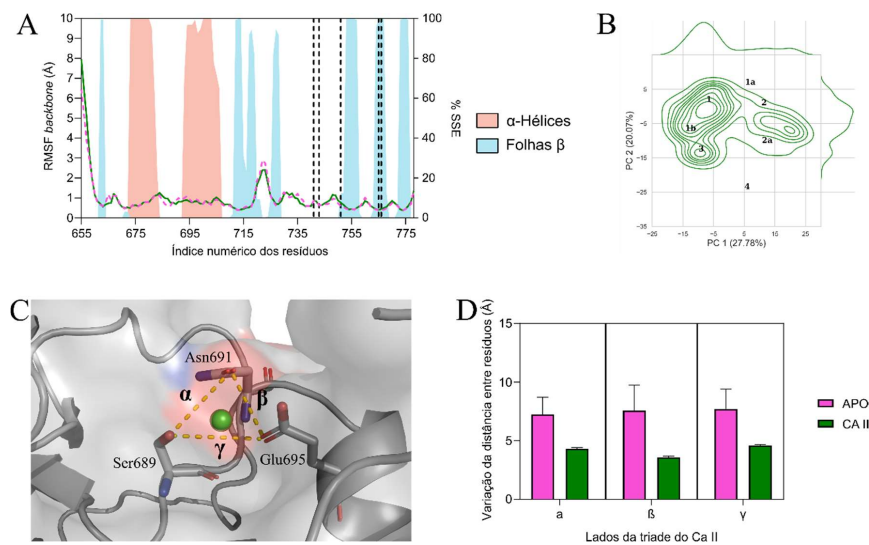
A – RMSD dos sistemas contendo  $\alpha$ -metilmanose (1CHO) e  $\alpha$ -manose-1,2-*O*- $\alpha$ -manose (2CHO); B e C – diagrama de interação entre os ligantes 1CHO e 2CHO e a CRD4 durante a simulação; D e E – PCA dos sistemas contendo  $\alpha$ -metilmanose (1CHO) e  $\alpha$ -manose-1,2-*O*- $\alpha$ -manose (2CHO). Fonte: Produção do autor.

A simulação com o complexo CRD4- $\text{Ca}^{2+}$  II (1  $\mu\text{s}$ ) apresenta o mesmo perfil de movimentação nas voltas já citadas. É de se destacar que este íon se aloja num sítio com pouca movimentação em todas as condições simuladas; é de se entender, então, que não é necessário para manter esta região com a conformação estável, alterando em pouco a estabilidade deste domínio. É importante notar que, segundo os experimentos de mutagênese dirigida e estudos de afinidade do CRD4 (MULLIN et al., 1997), o complexo ativo deste domínio só existe na presença de dois íons  $\text{Ca}^{2+}$ ; a posição do  $\text{Ca}^{2+}$  II também já foi encontrada em cristalografias recentes do CRD4 complexado a ligantes manosídicos, mas alguns complexos existem mesmo com sua ausência. Propõe-se então refletir aqui sobre um comportamento dinâmico do receptor, onde a presença do cálcio provavelmente se dá como um indicativo da forma ativa dele, ou ainda como um sítio de reconhecimento e sinalização para outras proteínas.

Os sistemas descritos até este ponto foram simulados sem o  $\text{Ca}^{2+}$  II. Quando este é introduzido no sistema, os resíduos que o quelam (Ser689, Asn691, Glu695) se tornam

rígidos, com seus grupos funcionais interagindo constantemente com o cátion (Figura 37). Não é possível observar, entretanto, diferenças significativas quanto à conformação do CRD4. Na ausência do  $\text{Ca}^{2+}$  II, os resíduos ligantes mantem-se interagindo com suas vizinhanças, mas são mais fortemente solvatados, já que a cavidade se encontra desocupada. A necessidade do  $\text{Ca}^{2+}$  auxiliar para a interação do CRD4 com manosídeos, como demonstrada por Mullin e colaboradores (1997), não foi observada nos experimentos, uma vez que o ligante não necessitou do  $\text{Ca}^{2+}$  II para se manter interagindo ao domínio e nenhuma alteração na conformação dos resíduos do MBS foi observada na presença e ausência deste íon. É possível, entretanto, que este seja importante na estabilização energética do complexo ativo CRD4-ligante, sendo importante para a diminuição da energia livre e entropia do sistema por congelar os resíduos quelantes em posição constante.

**Figura 37** – Análise conformacional do complexo proteico CRD4- $\text{Ca}^{2+}$  II



A – RMSF e estabilização de estruturas secundárias no sistema (verde) comparado à simulação da apoproteína (rosa pontilhado); B – PCA do sistema; C – Triáde do  $\text{Ca}^{2+}$  II e identificação das distâncias entre os três resíduos; D – variação da distância entre os resíduos das triades no sistema contendo a apoproteína e contendo o complexo CRD4- $\text{Ca}^{2+}$  II. Fonte: Produção do autor.

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

### 5.1 Estudo da síntese, caracterização estrutural e físico-química do dendron manossilado

A síntese proposta e caracterização dos produtos não pôde ser concluída, em especial devido às medidas de isolamento social impostas durante a pandemia de COVID-19, que impossibilitaram o trabalho laboratorial. Além disso, após a retomada das atividades presenciais, dificuldades na síntese, em especial a ausência de determinados reagentes e problemas nas metodologias encontradas na literatura também limitaram esta parte do trabalho. Como dito, o trabalho computacional foi proposto como complemento à parte sintética proposta, e acabou tornando-se o principal pelo grande avanço obtido.

É importante ressaltar que o estudo computacional, proposto para ser realizado de forma remota, permite propostas mais arrojadas de ligantes dirigidos para o RMM, possivelmente até modificando a localização e número de sacarídeos ligados a uma cadeia dendrímica, para adequação estérica e eletrônica de grupos diretores para maior eficiência tanto na interação com o receptor quanto na etapa de liberação para digestão lisossômica.

### 5.2. Estudo da estrutura e função do receptor de manose de macrófagos (RMM) sob luz da modelagem molecular

O longo tempo de simulação total com o CRD4 permite tirar algumas conclusões a respeito de sua estabilidade conformacional e a correlação entre sua atividade e a mudança de pH que ocorre em meio lisossômico. Este domínio é bastante estável, com EESE características que se mantêm conformados em diferentes condições. Os resíduos do MBS são, também, mantêm sua conformação quelados ao  $\text{Ca}^{2+}$  I. Esta ligação é estável o suficiente para a manutenção deste íon complexado frente à alteração da ionização de seus resíduos. O CRD4 realiza poucas interações com ligantes manosídicos, resumindo-se em duas interações entre as hidroxilas 3 e 4 dos sacarídeos e o  $\text{Ca}^{2+}$  I e demais resíduos do MBS, estando de acordo com os achados cristalográficos.

A protonação de resíduos provocada pelo meio ácido parece alterar em pouco a estabilidade geral do domínio. É de se observar, a diferença no movimento das voltas do domínio indicam que estas provavelmente participam da formação do complexo inativo do RMM em meio ácido. Como perspectiva, simulações com o receptor completo em meio ácido e meio neutro podem definitivamente auxiliar a entender como estas voltas fazem parte da alteração conformacional bruta provocada pela mudança de pH do meio.

O  $\text{Ca}^{2+}$  II é quelado por três resíduos com alta estabilidade, e confina-os conformacionalmente a se manterem nessa interação. Assim, a principal diferença entre modelos contendo ou não o  $\text{Ca}^{2+}$  II é a flexibilidade dos resíduos citados, que se encontram numa volta altamente solvatada e flexível. É importante apontar que a ausência deste íon em complexos estáveis CRD4-ligantes cristalografados ilustra perfeitamente a necessidade paradoxal deste íon para a formação e manutenção de complexos estáveis com ligantes. É possível que, em meio fisiológico, este íon seja importante para a manutenção da integridade do CRD4 frente aos demais domínios e às demais proteínas, impedindo eventos como proteólise ou pura repulsão estérica.

A próxima etapa na pesquisa sobre a interação RMM-manose e seu comportamento em diferentes meios se dará através de simulações contendo a forma solúvel do receptor, a fim de entender a dinâmica de estabilização dos domínios com suas vizinhanças e, possivelmente, a importância das voltas entre seus diversos domínios e a flexibilidade necessária para a digestão eficiente de seus ligantes. Além disso, estudos com ligantes mono-, di- e trissacarídicos, bem como com ligantes dendriméricos manosídicos, estão em execução, para elucidar quaisquer possíveis sítios de interação adicionais com o receptor.

O trabalho aqui exposto é bastante valioso no planejamento de experimentos computacionais envolvendo o CRD4 e ligantes. É de se imaginar que a reprodução de complexos RMM-ligantes através de simulações com o CRD4 seja suficiente; entretanto, observamos que este domínio é bastante estático, quando observado sozinho, trazendo pouco detalhamento sobre as interações entre ligantes e o receptor em contexto biológico. Cabe apontar, também, que ligantes polissacarídicos são pouco representativos quando simulados unicamente com este domínio, já que suas afinidades pelo receptor se dão especialmente pela afinidade dos diversos CRDs por eles, mesmo que esta seja diretamente atrelada à complexação inicial com o CRD4. Ademais, é pouco preditivo simular impactos estéricos e eletrônicos que ligantes projetados possam apresentar para

a alteração da estabilidade do complexo RMM-ligante, uma vez que o CRD4 é bastante compacto e apresenta alta superfície disponível para interação quando isolado, podendo trazer falsos positivos sobre uma possível relação estrutura-atividade.

## 6. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 1 set. 2015.

AMINPOUR, M.; MONTEMAGNO, C.; TUSZYNSKI, J. A. An Overview of Molecular Modeling for Drug Discovery with Specific Illustrative Examples of Applications. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1693, 30 abr. 2019.

ARAÚJO, R. V. DE et al. New Advances in General Biomedical Applications of PAMAM Dendrimers. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2849, nov. 2018.

ASTHANA, S. et al. Overexpressed Macrophage Mannose Receptor Targeted Nanocapsules- Mediated Cargo Delivery Approach for Eradication of Resident Parasite: In Vitro and In Vivo Studies. **Pharmaceutical Research**, v. 32, n. 8, p. 2663–2677, 1 ago. 2015.

BEKKER, H. et al. GROMACS - A PARALLEL COMPUTER FOR MOLECULAR-DYNAMICS SIMULATIONS: 4th International Conference on Computational Physics (PC 92). **PHYSICS COMPUTING '92**, p. 252–256, 1993.

BERN, C. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 30 jul. 2015.

BOSQUESI, P. L., ALMEIDA, A. E. D., BLAU, L., MENEGON, R. F., SANTOS, J. L. D., & CHIN, C. M. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 231-238, 2008.

BOWERS, K. J. et al. **Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters**. Proceedings of the 2006 ACM/IEEE conference on Supercomputing. **Anais...: SC '06**. New York, NY, USA: Association for Computing Machinery, 11 nov. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1145/1188455.1188544>>. Acesso em: 22 maio. 2023

BRUNTON, L. L.; KNOLLMANN, B. C.; HILAL-DANDAN, R. (EDS.). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. Thirteenth edition ed. New York: McGraw Hill Medical, 2018.

CALDAS, I. S.; SANTOS, E. G.; NOVAES, R. D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 15, p. 1797–1807, 13 out. 2019.

CENTER FOR DISEASE CONTROL **Chagas Disease - Epidemiology & Risk Factors**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 24 abr. 2023.

CHABRE, Y. M. et al. Expeditive Synthesis of Glycodendrimer Scaffolds Based on Versatile TRIS and Mannoside Derivatives. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 14, p. 5602–5605, 1 jul. 2008.

CHABRE, Y. M. et al. Expeditive Synthesis of Glycodendrimer Scaffolds Based on Versatile TRIS and Mannoside Derivatives. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 14, p. 5602–5605, 1 jul. 2008.

CHOI-SLEDESKI, Y. M.; WERMUTH, C. G. Designing Prodrugs and Bioprecursors. In: WERMUTH, C. G. et al. (Eds.). **The Practice of Medicinal Chemistry**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 2015. p. 657–696.

CHUNG, M. C. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofural e primaquina potencialmente antichagásicos**. 1996, 196 p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

CHUNG, M. et al. Prodrugs for the Treatment of Neglected Diseases. **Molecules**, v. 13, n. 3, p. 616–677, 19 mar. 2008.

CHUNG, M.-C. et al. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 155–180, jun. 2005.

CHUNG, M.-C. et al. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4779–4783, nov. 2003.

CLAS, S.-D.; SANCHEZ, R. I.; NOFSINGER, R. Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): recent progress and challenges. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 1, p. 79–87, jan. 2014.

COESSENS, V.; SCHACHT, E. H.; DOMURADO, D. Synthesis and in vitro stability of macromolecular prodrugs of norfloxacin. **Journal of Controlled Release**, v. 47, n. 3, p. 283–291, set. 1997.

CUMMINGS, R. D. The mannose receptor ligands and the macrophage glycome. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 75, p. 102394, ago. 2022.

DALLE VEDOVE, E.; COSTABILE, G.; MERKEL, O. M. Mannose and mannose-6-phosphate receptor-targeted drug delivery systems and their application in cancer therapy. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 14, p. 1701398, 2018.

DE ALBUQUERQUE SILVA, A. T. et al. Advances in Prodrug Design. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 893–914, 1 out. 2005.

DIAS, A. P. et al. Dendrimers in the context of nanomedicine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 573, p. 118814, 5 jan. 2020.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.

DNDi. Symptoms, transmission, and current treatments for Chagas disease. Disponível em: <<https://dndi.org/diseases/chagas/facts/>>. Acesso em: 20 maio. 2023.

EAST, L. The mannose receptor family. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1572, n. 2–3, p. 364–386, 19 set. 2002.

EBERHARDT, J. et al. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 8, p. 3891–3898, 23 ago. 2021.

FEINBERG, H. et al. Structural analysis of carbohydrate binding by the macrophage mannose receptor CD206. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, p. 100368, jan. 2021.

FEINBERG, H. et al. Structure of a C-type Carbohydrate Recognition Domain from the Macrophage Mannose Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 28, p. 21539–21548, jul. 2000.

FERREIRA, I. D. L. M.; SILVA, T. P. T. E. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 507–509, out. 2006.

GAO, J. et al. Novel Monodisperse PEGtide Dendrons: Design, Fabrication, and Evaluation of Mannose Receptor-Mediated Macrophage Targeting. **Bioconjugate Chemistry**, v. 24, n. 8, p. 1332–1344, 21 ago. 2013.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon- $\gamma$ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 10, p. 2501–2506, 1992.

GONZAGA, R. V. **Estudo da síntese de pró-fármacos autoimolativos como plataforma potencial para o transporte de fármacos contra doenças negligenciadas**. 2023, 159 p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo)

GONZAGA, R. V. et al. Perspectives About Self-Immolative Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 11, p. 3262–3281, 1 nov. 2020.

GONZAGA, R. V. et al. Targeting Groups Employed in Selective Dendrons and Dendrimers. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 219, dez. 2018.

GONZÁLEZ-MARTIN, G. et al. The pharmacokinetics of nifurtimox in chronic renal failure. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 6, jun. 1992.

HORISBERGER, M.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Some reactions of 2-propynyl glycosides. **Carbohydrate Research**, v. 23, n. 1, p. 144–147, jun. 1972.

HORISBERGER, M.; LEWIS, B. A.; SMITH, F. Some reactions of 2-propynyl glycosides. **Carbohydrate Research**, v. 23, n. 1, p. 144–147, jun. 1972.

HU, J. et al. Mannose-functionalized nanoscaffolds for targeted delivery in biomedical applications. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 13, n. 22, p. 3448–3459, 2018a.

HU, Z. et al. Structural basis of the pH-dependent conformational change of the N-terminal region of human mannose receptor/CD206. **Journal of Structural Biology**, v. 208, n. 3, p. 107384, dez. 2019.

HU, Z. et al. Structural insights into the pH-dependent conformational change and collagen recognition of the human mannose receptor. **Structure**, v. 26, n. 1, p. 60–71.e3, jan. 2018b.



HUTTUNEN, K. M.; RAUNIO, H.; RAUTIO, J. Prodrugs--from serendipity to rational design. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 3, p. 750–771, set. 2011.

JACKSON, Y. et al. Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 10, p. e69–e75, 15 nov. 2010.

JAHAGIRDAR, P. et al. Mannose Receptor and Targeting Strategies. Em: DEVARAJAN, P. V.; DANDEKAR, P.; D'SOUZA, A. A. (Eds.). **Targeted Intracellular Drug Delivery by Receptor Mediated Endocytosis**. AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 433–456.

KEATING, C. Ken Warren and the Rockefeller Foundation's Great Neglected Diseases Network, 1978–1988: The Transformation of Tropical and Global Medicine. **Molecular Medicine**, v. 20, n. S1, p. S24–S30, jan. 2014.

KOSTOVA, V. et al. Targeted Shiga toxin–drug conjugates prepared via Cu-free click chemistry. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 22, p. 7150–7157, nov. 2015.

KOSTOVA, V. et al. Targeted Shiga toxin–drug conjugates prepared via Cu-free click chemistry. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 22, p. 7150–7157, nov. 2015.

LEE, C. C. et al. Designing dendrimers for biological applications. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1517–1526, dez. 2005.

LEWIS, M. D. et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 1285–1300, set. 2014.

LYU, Z. et al. Poly(amidoamine) dendrimers: covalent and supramolecular synthesis. **Materials Today Chemistry**, v. 13, p. 34–48, 1 set. 2019.

MARTINEZ-POMARES, L. The mannose receptor. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, n. 6, p. 1177–1186, 1 dez. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Situação Epidemiológica**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica>>. Acesso em: 20 maio. 2023.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MÜLLER KRATZ, J. et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943–957, 3 out. 2018.

MULLIN, N. P.; HITCHEN, P. G.; TAYLOR, M. E. Mechanism of Ca<sup>2+</sup>- and monosaccharide binding to a C-type carbohydrate-recognition domain of the macrophage mannose receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 9, p. 5668–5681, fev. 1997. B

NASCIMENTO, L. A. **Nanotransportadores dendriméricos de fármacos e compostos bioativos de liberação intracelular. Síntese do respectivo dendron.** 2018, 28 p. (Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo)

NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease: *T. cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 634–643, maio 2012.

PELUFFO, G. et al. l-arginine metabolism during interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 8, p. 363–369, ago. 2004.

RAZGULIN, A. V.; MECOZZI, S. Synthesis, emulsification and self-assembly properties of sugar-containing semifluorinated amphiphiles. **Carbohydrate Research**, v. 406, p. 10–18, abr. 2015.

RAZGULIN, A. V.; MECOZZI, S. Synthesis, emulsification and self-assembly properties of sugar-containing semifluorinated amphiphiles. **Carbohydrate Research**, v. 406, p. 10–18, abr. 2015.

REN, B. et al. Zemplén transesterification: a name reaction that has misled us for 90 years. **Green Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1390–1394, 2015.

REN, B. et al. Zemplén transesterification: a name reaction that has misled us for 90 years. **Green Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 1390–1394, 2015.

SANTOS, S. S. et al. Peptide dendrimers: drug/gene delivery and other approaches. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 95, n. 9, p. 907–916, set. 2017.

SCARIM, C. B. et al. Synthesis, characterization, and activity of hydroxymethylnitrofurazone nanocrystals against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. **Drugs and Drug Candidates**, v. 1, n. 1, p. 43–55, dez. 2022.

SILVEIRA, A. C.; DIAS, J. C. P. O controle da transmissão vetorial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. suppl 2, p. 52–63, 2011.

ST JEAN, D. J.; FOTSCH, C. Mitigating heterocycle metabolism in drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 6002–6020, 12 jul. 2012.

TALLEY, E. A.; REYNOLDS, D. D.; EVANS, WM. L. The Synthesis of Certain Disaccharide Acetates in the Mannose Series <sup>1</sup>. **Journal of the American Chemical Society**, v. 65, n. 4, p. 575–582, abr. 1943.

TALLEY, E. A.; REYNOLDS, D. D.; EVANS, WM. L. The Synthesis of Certain Disaccharide Acetates in the Mannose Series <sup>1</sup>. **Journal of the American Chemical Society**, v. 65, n. 4, p. 575–582, abr. 1943.

TAYLOR, P.; GORDON, S.; MARTINEZPOMARES, L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 2, p. 104–110, fev. 2005.

TOMALIA, D. A.; FRÉCHET, J. M. J. Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective\*: Highlight. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 40, n. 16, p. 2719–2728, 15 ago. 2002.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, maio 2001.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 54, p. 5.6.1-5.6.37, 20 jun. 2016.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. **Methods in carbohydrate chemistry**, v. 2, n. 2, p. 211-215, 1963.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 20 maio. 2023.

YOO, E. J. et al. Copper-Catalyzed Synthesis of N-Sulfonyl-1,2,3-triazoles: Controlling Selectivity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 10, p. 1730–1733, 2007.

YOO, E. J. et al. Copper-Catalyzed Synthesis of N-Sulfonyl-1,2,3-triazoles: Controlling Selectivity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 10, p. 1730–1733, 2007.

ZHU, S. et al. Targeting of tumor-associated macrophages made possible by PEG-sheddable, mannose-modified nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 9, p. 3525–3530, 3 set. 2013.