

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

Estudos sobre planejamento de tuberculostáticos potenciais derivados de dendron de ácido 2,2-*bis*-(hidroximetil)propiônico(*bis*-MPA) com associação de isoniazida e ibuprofeno: síntese e ensaio biológico do derivado de ibuprofeno

**GABRIEL LUIS CARDOSO GRECO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos FCF-USP para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: **PROFA. TITULAR ELIZABETH IGNE FERREIRA**

São Paulo

2021

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

Estudos sobre planejamento de tuberculostáticos potenciais derivados de dendron de ácido 2,2-*bis*-(hidroximetil)propiônico(*bis*-MPA) com associação de isoniazida e ibuprofeno: síntese e ensaio biológico do derivado de ibuprofeno

**GABRIEL LUIS CARDOSO GRECO**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos FCF-USP para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: **PROFA. TITULAR ELIZABETH IGNE FERREIRA**

São Paulo

2021

Gabriel Luís Cardoso Greco

**Estudos sobre planejamento de tuberculostáticos potenciais  
derivados de dendron de ácido 2,2-bis-  
(hidroximetil)propiónico(*bis*-MPA) com associação de  
isoniazida e ibuprofeno: síntese e ensaio biológico do derivado  
de ibuprofeno**

Comissão Julgadora

da

Dissertação/Tese para obtenção do Título de Mestre

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Igne Ferreira  
Orientadora/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

---

3º. examinador

---

4º. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2021.

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

G791e Greco, Gabriel Luis Cardoso  
Estudos sobre planejamento de tuberculostáticos potenciais derivados de dendron de ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico(bis-MPA) com associação de isoniazida e ibuprofeno: síntese e ensaio biológico do derivado de ibuprofeno / Gabriel Luis Cardoso Greco. - São Paulo, 2021.  
119 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos.  
Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne

1. Química Medicinal. 2. Latenciação. 3. Tuberculose. 4. Ibuprofeno. 5. Dendrimeros. I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

## Dedicatórias

Primeiramente, gostaria de dedicar este trabalho aos meus pais, Antônio Inácio Greco e Cássia A. Cardoso Greco. Agradeço a vocês por me propiciarem toda educação e desenvolvimento necessário para chegar até aqui sempre repleto de muito amor e carinho. A realização deste projeto é uma vitória nossa. Obrigado por sempre me apoiarem em minhas decisões e por me guiarem nos momentos de desamparo. Vocês terão sempre o meu reconhecimento e minha gratidão eterna por tudo que vocês fizeram e ainda fazem por mim. EU AMO MUITO VOCÊS!

*“- Why do we fall master Bruce? So that we can learn to pick ourselves up.  
- You still haven't given up on me?  
- Never.”*

**Batman Begins**

À minha querida orientadora, Profª Titular Elizabeth Igne Ferreira que, desde 2016 quando a conheci pessoalmente, abriu as portas da FCF-USP para mim e sempre me tratou com muita educação e carinho. Professora, se há uma pessoa que eu vou levar para o resto da minha vida é você, com certeza. Eu não seria 10% do pesquisador, eterno aprendiz e homem que hoje sou sem seus ensinamentos, orientações, conversas e puxões de orelha. Eu não tenho palavras para descrever o quão importante você é e sempre será na minha vida. Você sempre me inspirou a perseverar e boa parte do meu esforço e da minha evolução foram para retribuir a você toda confiança em mim depositada desde o primeiro dia. Meu eterno muito obrigado a você!

*“Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained.”*

**Marie Curie**

À minha namorada, Thaís Valente Vieira, por todo apoio e motivação nos momentos difíceis pelos quais passei. Por tornar toda minha caminhada mais alegre. Você é muito mais do que minha namorada, companheira, ou melhor amiga...você é tudo isso junto e mais um pouco, nos momentos bons e nos momentos ruins. Eu nunca vou desistir de lhe apoiar e de querer o seu melhor. Vou levar você no meu coração onde quer que eu vá.

Sei que a convivência comigo não é tão simples e, por isso, eu agradeço, pois são as pequenas atitudes diárias que fortalecem nosso sentimento. Não existem palavras que descrevam o quanto eu amo você; é uma tarefa mais árdua do que escrever qualquer dissertação ou artigo científico. Espero poder aproveitar tudo o que temos pela frente ainda. Te amo muito!!

*“Seremos donos do nosso amanhã se estivermos unidos  
Em sintonia com os nossos sonhos  
Mesmo se não formos iguais  
Pois não somos iguais  
(...)”  
Dona do meu pensamento, você, nossa história”*

**Charlie Brown Jr.**

Às minhas irmãs, Beatriz Greco e Raquel Greco, por toda cumplicidade durante esses meus 26 anos. Eu amo muito vocês duas e agradeço por todas às vezes que vocês salvaram minha vida...as vezes nem tanto (como aquele passeio de bicicleta na Disney em que vocês me deixaram sozinho com 4 anos rs). Às minhas avós Diolinda Cardoso e Maria José Cardoso, que sempre cuidaram de mim e hoje eu tenho a missão de retribuir todo esse carinho, meu muito obrigado, eu amo vocês. Aos meus tios Francisco Greco e Margarida Greco, que nunca serão esquecidos por mim e terão eternamente um lugar guardado em meu coração. Aos meus sobrinhos Lucas Greco Modesto e Sofia Greco Modesto que, estão no começo ainda de suas caminhadas, obrigado por trazerem alegria à nossa família. Por fim, ao meu falecido avô Virgílio Cardoso, eu queria muito que você pudesse ver essa conquista. Eu sinto muito a sua falta Vô, não virei jogador de futebol, mas espero poder orgulha-lo com o caminho que escolhi trilhar, eu te amo!

## **Family**

Noun

---

*Life's greatest blessing. A group that dreams, laughs, plays and loves together. Those whom you can always count on. Always present, not only in the good times. The most precious gift.*

Ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Agradecimentos

Ao Departamento de Imunologia do ICB-IV da Universidade de São Paulo.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Aos professores Dr. Jonas Gruber e Dr.<sup>a</sup> Daniela Rando, pela discussão enriquecedora durante o exame de qualificação.

À professora Dr.<sup>a</sup> Jeanine, de quem tive a oportunidade de receber seu conhecimento através de aulas e, principalmente, durante nossos seminários do LAPEN.

À Dr.<sup>a</sup> Mônica Zannini, um anjo em minha vida, que me mostrou o caminho para que os objetivos fossem alcançados, fora todos os ensinamentos e discussões enigmáticas sem fim. Serei eternamente grato a você, Mônica.

Ao Prof. Dr. Mario Hirata, pela colaboração e parceria que tornou possível a obtenção dos resultados biológicos. À professora Dr.<sup>a</sup> Maria Regina do ICB-IV do Departamento de Imunologia, também, pela parceria.

Aos doutorandos, Igor Santiago-Carvalho e Caio Bonfim por “toparem” e conduzirem os ensaios de atividade de inibição de crescimento e demais testes ainda por vir. Eu aprendi muito com nossas discussões e espero poder aprender muito mais.

Aos meus colegas de LAPEN, Charles, Rodrigo, João, Soraya, Marina, Diego, Bruna, Lucas, Renan e Marcos que, durante esse período, me ajudaram muito e, principalmente, me acolheram muito bem. Aos meus colegas de LAPEN que foram entrando ao longo do tempo, Lucas, Pune, Bia, Cecília, Cinthya, Sara. Boas-vindas aos novos integrantes da família LAPEN: Erick, Alice, Felipe, Gabriela, Valquiria e Denise, ansioso para conhecê-los pessoalmente assim que for possível.

Aos amigos do LAPESSB que fiz nessa caminhada, Mauricio, Nuno, Thais, Vitor e Karina.

Ao meu amigo Natan por todo suporte e ensinamentos, sempre com muita paciência e diática.

Aos meus amigos de graduação, que tornaram todo caminho mais prazeroso, Guilherme, Thaís, Júlia, Larissa, Kaylani, Levi e Mayra.

Aos meus fieis amigos de caminhada, Allan, Pituca (Pedro Henrique), Ronaldo, Derek, Pedro Toledo, Rafael, Lucas Lopes, Caio Ribau, Daniel Zaghi, Yuri Andrade, Guilherme, Matheus Tosta, Bruno Fernandes e Murilo.

Às minhas amigas Milena Fidalgo, Isabel Bacellar, Yasmin Barja, Izah Barja, Maria Luísa, Luma, Nathália, Jéssica, Carolina e Giovana.

A todos meus amigos e amigas que ficaram de fora dessa lista, mas, de alguma forma, contribuíram com o meu crescimento durante esse período.

À família Valente e família Vieira por todo suporte, motivação e por me receberem de braços abertos como um de vocês. Obrigado por tudo!

Aos funcionários da Universidade de São Paulo, Kelma e David, por todo suporte.

*“I sit beside the fire and think  
of all that I have seen,  
of meadow-flowers and butterflies  
in summer that have been;*

*Of yellow leaves and gossamer  
in autumns that there were,  
with morning mist and silver sun  
and wind upon my hair.*

*I sit beside the fire and think  
of how the world will be  
when winter comes whitout a spring  
that I shall ever see.*

*For still there are so many things  
that I have never seen:  
in every wood in every spring  
there is a different green.*

*I sit beside the fire and think  
of people long ago,  
and people who will see a world  
that I shall never know.*

***The Fellowship of the Ring – J.R.R. Tolkien** all the while I sit and think  
of times there were before,  
I listen for returning feet  
and voices at the door.”*

## Resumo

GRECO, G.L.C. **Estudos sobre planejamento de tuberculostáticos potenciais derivados de dendron de ácido 2,2-bis-(hidroximetil)propiónico(bis-MPA) com associação de isoniazida e ibuprofeno: síntese e ensaio biológico do derivado de ibuprofeno.** 2021. 91p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e envolve, principalmente, graves problemas pulmonares. No entanto, pode-se alojar em outros tecidos. A terapia atual da TB tem duração mínima de seis meses e é composta por duas fases de tratamento, sendo a isoniazida e a rifampicina os principais fármacos da terapia de primeira linha. Durante o tratamento é comum os pacientes sentirem desconfortos como: náusea, vômito, cefaleia, desconforto abdominal entre outros, devido aos efeitos adversos provocados pelos medicamentos. A taxa de abandono e a coinfeção por HIV constituem preocupação mundial no tratamento da TB, uma vez que o HIV, por envolver diminuição da imunidade, facilita a infecção e a manifestação da doença pelo *M. tuberculosis*. Já o abandono do tratamento pode resultar em resistência das micobactérias aos fármacos, dificultando o processo de cura e aumentando os riscos de morte. Ante esse cenário, há necessidade de se introduzir novos fármacos tuberculostáticos. Dentre os métodos de modificação molecular de compostos bioativos utilizados com o intuito de aprimorar a respectiva eficácia e introduzir novas alternativas terapêuticas, destaca-se a latenciação. Esse processo possui como principal objetivo o aprimoramento das propriedades farmacêuticas, farmacocinéticas e, indiretamente, das farmacodinâmicas. Já os dendrímeros são macromoléculas com diversas aplicações biológicas, entre elas a utilização como transportador de fármacos na latenciação. Por outro lado, o reposicionamento de fármacos oferece um caminho mais rápido e de menor custo, quando comparado ao método tradicional de descoberta de novos compostos bioativos, sendo, assim, estratégia válida na busca de novos tratamentos para a TB. Face ao exposto, este projeto teve por objetivo inicial desenvolver pró-fármaco e fármaco dirigido, com manose como grupo diretor, derivado de dendron (*bis-MPA*), com associação de isoniazida e ibuprofeno. Este último é consagrado como anti-inflamatório e, desta forma, constitui-se em reposicionamento para a TB. Ademais, a associação desses fármacos tem o propósito de oferecer dois mecanismos distintos de ação, resultando em sinergismo além de seletividade, diminuindo os efeitos adversos dos fármacos envolvidos e minimizando o surgimento de micobactérias resistentes. Dos compostos planejados, obtiveram-se, nesse trabalho, os intermediários como succinilisoniazida, *bis-MPA* protegido e o dendron de ibuprofeno. Os compostos obtidos foram analisados por RMN 1H e 13C e alguns deles no IV. O intermediário de ibuprofeno também foi caracterizado através de RMN bidimensional. Este intermediário foi submetido a ensaios *in vitro*, entre eles, ensaios que demonstraram atividade bactericida em cepas H<sub>37</sub>RV em concentrações de 8,1 nM – 208 nM.

**Palavras-chave:** Tuberculose; dendrímeros; latenciação; reposicionamento; ibuprofeno.

## Abstract

GRECO, G.L.C. **Design and evaluation of potential tuberculostatic analogues of 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionic acid (*bis*-MPA) with association of ibuprofen and isoniazid: synthesis and biological evaluation of ibuprofen analogue.** 2021. 91p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) that mainly affects the lung tissue. Currently, tuberculosis chemotherapy can last for at least 6 months and is divided in two stages. Isoniazid and rifampicin are the most important drugs of the first line drugs. During the treatment patients can develop some side adverse effects caused by the drugs used like nausea, emesis, headache and abdominal pain, which can lead to the treatment dropout. Co-infection with HIV and treatment dropout rate are two concerning problems worldwide. The HIV leads to immunosuppression, which can facilitate the infection and also the manifestation of the disease caused by the *Mtb*. On the other hand, incomplete treatment can lead to resistant forms of TB that are more lethal and difficult to cure. New drugs and treatment options are needed to overcome these problems. Molecular modification of bioactive compounds can be a way out to introduce new drug candidates. Latentiation is a method of molecular modification that can increase the efficacy of bioactive candidates. This method consists of the enhancement of pharmaceutical properties, pharmacokinetics and indirectly the pharmacodynamic properties. Dendrimers are known for being macromolecules with a vast range of biological application such as drug delivery in latentiation. In addition, drug repositioning offers a faster and inexpensive drug development, when compared with the traditional method of discovering new drug candidates, which is a logical alternative since TB is strongly associated with poverty. Against this background this project had the initial purpose of developing a targeted drug and prodrug derived of *bis*-MPA dendron with association of isoniazid and ibuprofen repositioning utilizing mannose as director group. Furthermore, the association between ibuprofen and isoniazid had the purpose to provide two distinct mechanism of action with selectivity reducing the side effects issue and also the upcoming of *Mtb* resistant strains. Among the planned compounds of this project, three different intermediaries were obtained and analyzed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and some of them by infrared spectroscopy. The ibuprofen intermediary was also characterized by two-dimensional NMR. *In vitro* evaluation revealed that the ibuprofen intermediary was active against H<sub>37</sub>RV *Mtb* strain in concentrations ranging from 8,1 nM to 208 nM.

**Keywords:** Tuberculosis; dendrimers; pro drug; ibuprofen; repositioning.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	4
1.1 Epidemiologia da tuberculose.....	4
1.2 Quimioterapia da tuberculose.....	6
1.2.1 Resistência do M. tuberculosis ao tratamento.....	8
1.2.2 Novos fármacos e associações para formas resistentes de tuberculose.....	12
1.2.3 Reposicionamento de fármacos em tuberculose.....	15
1.3 Método da latenciação no planejamento de novos fármacos .....	17
1.3.1 Dendrímeros e dendrons como transportadores de fármacos/compostos bioativos.....	18
1.3.2 Manose como grupo diretor em dendrímeros dirigidos.....	24
<b>2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS</b> .....	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
3.1 Solventes e reagentes.....	27
3.2 Métodos de análise.....	28
3.2.1 Ponto de fusão.....	28
3.2.2 Espectrometria de ressonância magnética (RMN).....	28
3.2.3 Espectrometria no Infravermelho (IV).....	29
3.2.4 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	29
3.2.5 Cromatógrafo automático flash Isolera™ Prime, Biotage.....	29
3.3 Procedimentos experimentais.....	30
3.3.1 Síntese do ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA) protegido.....	30
3.3.2 Síntese do hemissuccinamida de isoniazida.....	31
3.3.3 Síntese dos dendrons utilizando os respectivos cloretos de ácido.....	32
3.3.3.1 Síntese do dendron de ibuprofeno utilizando cloreto de tionila como agente conversor.....	32
3.3.3.2 Síntese do dendron de ibuprofeno utilizando cloreto de oxalila como agente conversor.....	33
3.3.3.3 Síntese do dendron de hemissuccinamida de isoniazida utilizando cloreto de tionila como agente conversor.....	34
3.3.3.4 Síntese do dendron de hemissuccinamida de isoniazida utilizando cloreto de oxalila como agente conversor.....	35
3.3.4 Síntese dos dendrons utilizando EDC ou DCC como agentes condensantes.....	36
3.3.4.1 Síntese do dendron de ibuprofeno utilizando EDC como agente condensante.....	36
3.3.4.2 Síntese do dendron de hemissuccinamida de isoniazida utilizando EDC e DCC como agentes condensantes.....	37
3.4 Métodos de avaliação da atividade biológica .....	38
3.4.1 Cultivo micobacteriano.....	38
3.4.2 Atividade antimicobacteriana.....	39
3.4.3 Cultivo celular.....	39
3.4.4 Avaliação da citotoxicidade celular.....	40
3.4.5 Capacidade inibitória em cultura de macrófagos infectados.....	40
3.4.6 Análises estatísticas.....	41

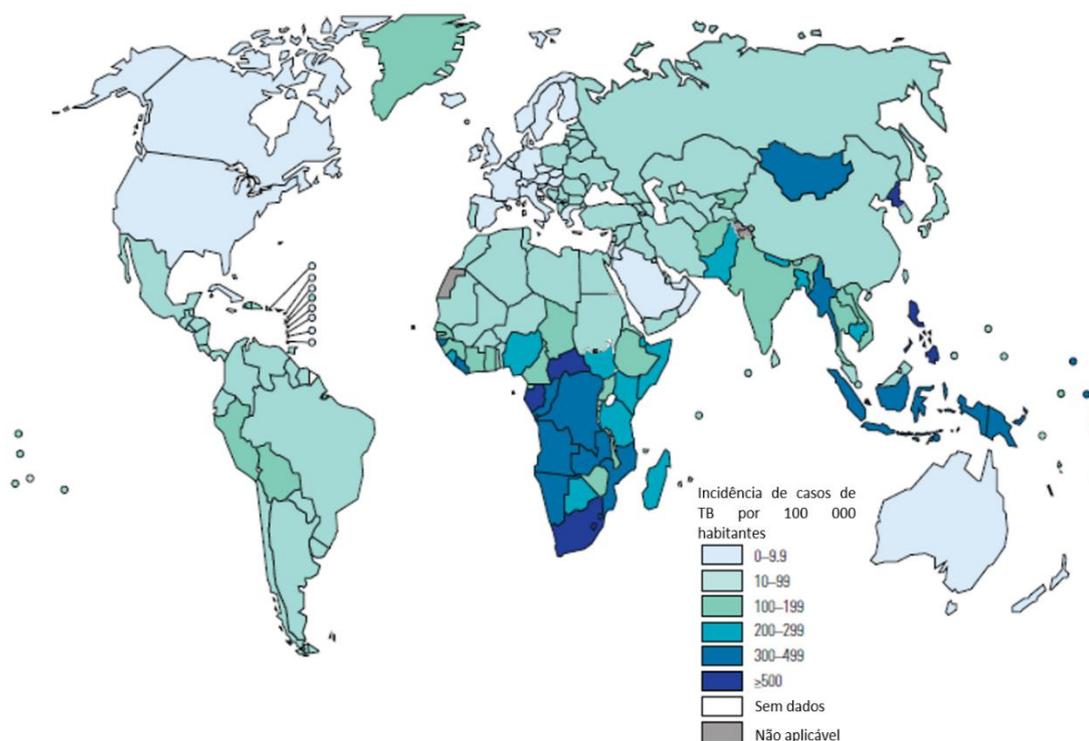
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42
4.1 Planejamento sintético.....	42
4.2 Síntese do dendron de ibuprofeno.....	42
4.3 Síntese do dendron de isoniazida.....	65
4.4 Avaliação da atividade biológica.....	74
4.4.1 Avaliação da citotoxicidade celular.....	74
4.4.2 Avaliação da inibição do crescimento das células micobacterianas Mtb H37Rv, Mtb M299 e Mbv MP287/03.....	75
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	80
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	85
<b>ANEXOS</b> .....	93

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia da tuberculose

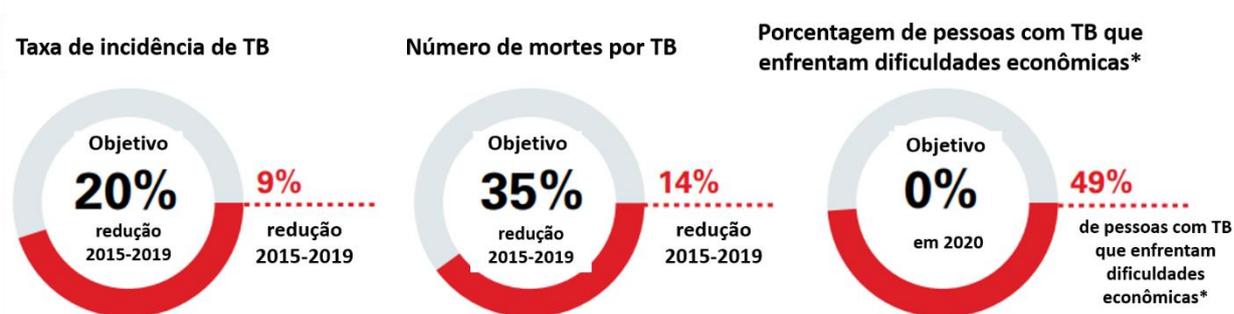
A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), que afeta principalmente os pulmões, mas que pode se manifestar em outros órgãos. A transmissão do bacilo ativo ocorre por via aérea, pela qual um indivíduo infectado emite partículas no ar, através da tosse ou espirro, em forma de aerossóis contendo bacilos ativos de *M. tuberculosis*, infectando outros indivíduos (TB Alliance, 2019).

Estimativas publicadas no Global Tuberculosis Report de 2020 (WHO, 2020) indicam cerca de 10 milhões de novos casos no plano mundial (Figura 1), em 2019, sendo 12% constituídos por crianças. De maneira geral, a incidência é maior no sexo masculino.



**Figura 1** – Taxa de incidência de TB no mundo, em 2019 (adaptado de WHO, 2020).

Apenas oito países são responsáveis por 66,2% dos casos de TB no mundo: Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão Filipinas, Bangladesh e África do Sul. Em 2019, estimavam-se 1,2 milhões de mortes por TB além das 300 mil mortes resultantes da coinfeção com HIV. Apesar de se ter registrado decréscimo da incidência da doença mundialmente, este ainda não foi suficiente para atingir a meta projetada em 2015, de diminuir, anualmente, cerca de 4-5% o número de novos casos até 2020. Dos 20% de decréscimo projetado, apenas 9% foi atingido entre 2015-2020. O esquema 1 mostra os objetivos traçados pela *End TB Strategy*, em 2015.



\* Situações em que o custo do tratamento para o paciente é igual ou maior a 20% da renda familiar.

**Esquema 1** – Objetivos traçados pela *End TB Strategy* e os resultados obtidos (Adaptado de WHO, 2020)

No Brasil, ao final de 2019, registraram-se 96.000 casos de TB/HIV negativos e 11 mil com coinfeção por HIV. Segundo dados da OMS de 2019 (WHO, 2020), registraram-se, no País, ao final de 2019, 4.900 mortes de pacientes HIV negativos e 1.800, com HIV positivo. Apesar de ser um país em que mais de 80% dos infectados possuem tratamento garantido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o Brasil faz parte dos 30 países com maior número de casos de TB no mundo. Ressalta-se, então, a necessidade de novos tratamentos, uma vez que garantir acesso ao tratamento não garante a diminuição de novos casos. Dados divulgados pela OMS revelam que o número de novos casos ao final de 2017 era de 91 mil casos, 95 mil, ao final de 2018 e 96 mil, ao final de 2019 (WHO, 2018, 2019, 2020).

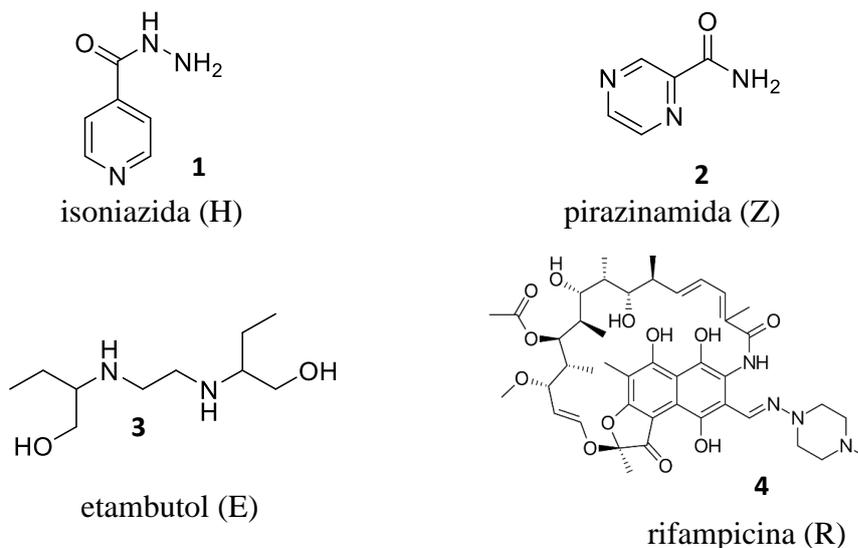
## 1.2 Quimioterapia da tuberculose

A quimioterapia atual da tuberculose, segundo o Ministério da Saúde do Brasil (2018), consiste em longo tratamento, que pode durar de seis meses até dois anos ou mais (Quadro 1). O tratamento consiste em duas fases: a primeira, intensiva, na qual são administrados quatro fármacos durante quatro meses: 2HRZE, correspondendo a, respectivamente, isoniazida (H), rifampicina (R), pirazinamida (Z) e etambutol (E); já a segunda fase, a de manutenção, é constituída pela administração de 4HR durante dois meses.

**Quadro 1** - Regime da quimioterapia da tuberculose preconizado pelo Ministério da Saúde, Brasil, em 2018.

	Plano	Fármacos (mg/comprimido)	Peso, kg	Dose
<b>Fase intensiva</b> ✓ 2 meses	<b>2RHZE</b> - Rifampicina (R) - Isoniazida (H) - Pirazinamida (Z) - Etambutol (E)	R (150) H (75) Z (400) E (275)	≤ 20	10/10/35/25 mg/kg por dia
			20 - 35	2 comprimidos
			36 - 50	3 comprimidos
			> 50	4 comprimidos
<b>Fase de manutenção</b> ✓ 4 meses	<b>4RH</b> - Rifampicina (R) - Isoniazida (H)	R (150) H (75)	≤ 20	10/10 mg/kg por dia
			20 - 35	2 comprimidos
			36 - 50	3 comprimidos
			> 50	4 comprimidos

A Figura 2 mostra a estrutura química desses fármacos.



**Figura 2** – Fármacos utilizados na primeira e segunda fases do tratamento da TB.

Segundo o Ministério da Saúde (2018), a maior dificuldade é o abandono do tratamento devido à melhora do quadro sintomático. Logo nas primeiras semanas de tratamento, os pacientes se sentem melhor e o abandonam. No entanto, ao realizar o tratamento de forma incompleta ou incorreta, cria-se resistência aos fármacos de primeira linha (WHO, 2018). Em um estudo clínico realizado na Coreia do Sul, 220 pacientes com tuberculose foram tratados com os fármacos anti-TB de primeira linha. O tratamento resultou em 85% de taxa de cura dos pacientes e os principais efeitos adversos reportados foram distúrbios gastrointestinais (18,4%), transtornos psiquiátricos (5,5%), artralgia (4,7%), hepatite (3,9%), neuropatia periférica (3,1%), hipotireoidismo (2,3%), crises epilépticas (2%), efeitos dermatológicos (2%), ototoxicidade (1,6%) e nefrotoxicidade (1,2%) (YANG *et al.*, 2017).

### 1.2.1 Resistência do *M. tuberculosis* ao tratamento

**Quadro 2** – Mecanismo de ação e de resistência dos dois principais fármacos no tratamento da TB.

Fármacos	Mecanismo de ação	Mecanismo de resistência
<b>Isoniazida</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inibição da síntese dos ácidos micólicos (AM) da parede células da micobactéria, através da inibição da InhA (enzima que atua na biossíntese do AM) (UNISSA <i>et al.</i>, 2016);</li> <li>- Precisa ser metabolizada para radical isonicotínico pela KatG (PIERATTELLI <i>et al.</i>, 2004);</li> <li>- Radical isonicotínico se liga ao NADH formando um complexo InhA-isonicotínico-NADH, travando a capacidade de síntese da enzima (BANERJEE <i>et al.</i>, 1994; RAWAT <i>et al.</i>, 2003);</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A maioria dos mecanismos de resistência do <i>Mtb</i> à isoniazida está relacionado a mutações na enzima KatG (UNISSA <i>et al.</i>, 2016);</li> <li>- A mutação mais incidente é S315T, que diminui a afinidade da KatG pela isoniazida (KAPETANAKI <i>et al.</i>, 2003);</li> <li>- Outras mutações pontuais resultam em diminuição da afinidade da KatG pela isoniazida ou inibição da capacidade de oxidativa da enzima (BERTRAND <i>et al.</i>, 2004);</li> </ul>
<b>Rifampicina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inibição da síntese de RNA através da inibição da RNA polimerase micobacteriana (LAGUERRE <i>et al.</i>, 2018);</li> <li>- Se liga ao canal de saída da RNA polimerase na subunidade <math>\beta</math>, bloqueando o processo de transcrição (LAGUERRE <i>et al.</i>, 2018);</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- O mecanismo de resistência à rifampicina está associado a mutações no gene <i>rpoB</i>, responsável pela codificação da RNA polimerase (ALIFANO <i>et al.</i>, 2015; RAHIM <i>et al.</i>, 2012);</li> <li>- As principais mutações estão relacionadas a alterações de resíduos próximos ao sítio catalítico e sítios adjacentes da RNA polimerase (ALIFANO <i>et al.</i>, 2015; RAHIM <i>et al.</i>, 2012);</li> <li>- As mutações mais incidentes são nos resíduos S531L, H526Y e D516V (ALIFANO <i>et al.</i>, 2015; RAHIM <i>et al.</i>, 2012);</li> </ul>

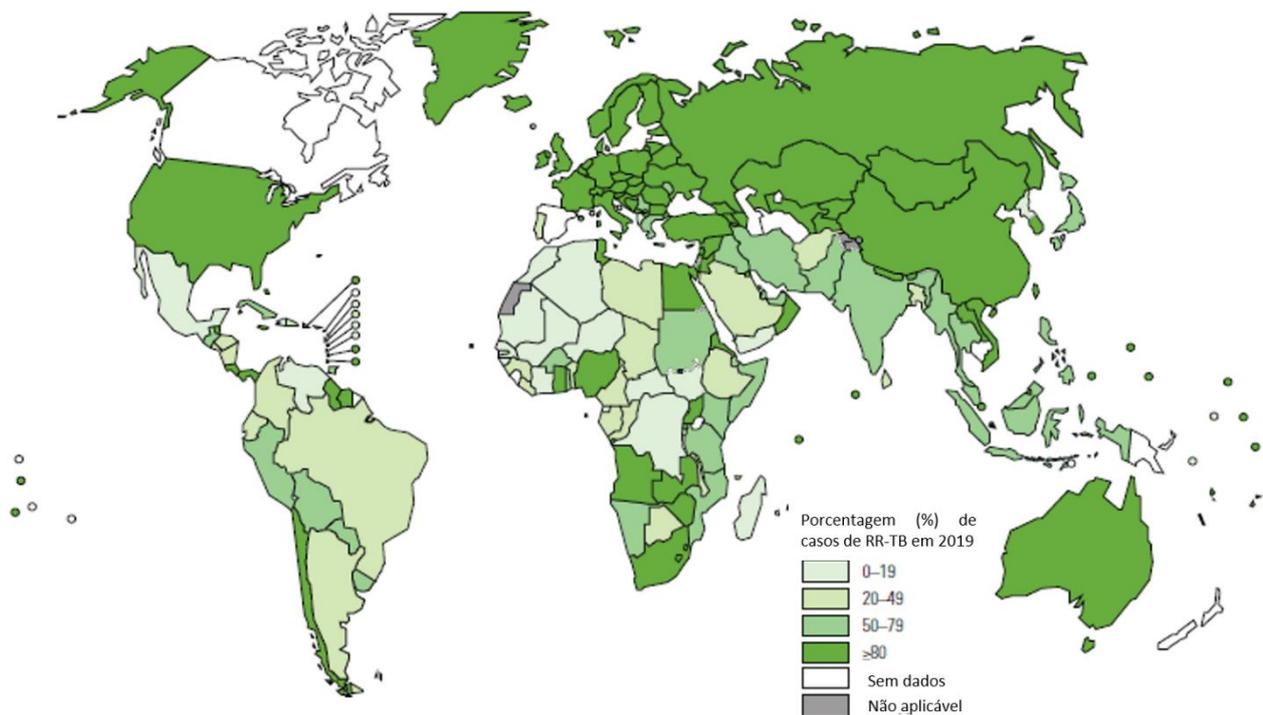
A TB multirresistente (MDR-TB) surge quando há resistência à isoniazida e à rifampicina e é denominada TB resistente à rifampicina (RR-TB), quando a resistência é associada apenas à rifampicina. Já a TB extensivamente resistente (XDR-TB) surge quando há resistência à isoniazida, à rifampicina, com resistência adicional a qualquer fluorquinolona e pelo menos a um aminoglicosídeo injetável. Vale ressaltar que os tratamentos disponíveis para as formas resistentes são mais tóxicos, de maior custo e com menor taxa de cura. Para evitar a ocorrência de abandono ao tratamento, a OMS recomenda a adesão da estratégia do tratamento diretamente observado de curta duração, TOD, em inglês, DOT, que possui cinco diretrizes (WHO, 2018):

- Compromisso político e apoio financeiro para a manutenção das atividades de controle da tuberculose;
- Identificação dos casos de tuberculose através da baciloscopia do escarro de sintomáticos respiratórios;
- Esquema de fármacos antituberculose padronizado e administrado através de TDO, pelo menos nos dois primeiros meses de tratamento;
- Garantia do suprimento regular dos medicamentos antituberculose e
- Sistema de notificação e avaliação dos resultados do tratamento de cada paciente e do programa de controle de tuberculose como um todo.

Apesar de o método TDO permitir o contato frequente entre o paciente e os profissionais de saúde, o que favoreceria a adesão ao tratamento, revisões sistemáticas descritas por Seaworth et. al (2013) e Karumbi et al (2015) não apontam maior efetividade desse método em comparação ao tratamento autoadministrado. No entanto, deve-se levar em consideração outros fatores que influenciam no tratamento da TB e não apenas a tomada dos medicamentos, como:

- Fatores relacionados ao paciente: idade, comorbidades, estado imunológico, estado nutricional, adesão ao tratamento, características genéticas;
- Fatores relacionados ao bacilo: virulência do bacilo, suscetibilidade da cepa, extensão da doença;
- Fatores relacionados ao atendimento: acesso do paciente ao sistema de saúde, supervisão do tratamento e capacidade da equipe saúde e
- Fatores relacionados ao tratamento: quantidade de cada fármaco administrado, biodisponibilidade, sinergia ou antagonismo entre os fármacos e interação medicamentosa com outros fármacos.

Mesmo com a discussão da eficácia do TDO *versus* tratamento autoadministrado, o primeiro continua sendo a prática utilizada pelos programas de tuberculose dos Estados Unidos e Europa, isso devido à alta conversão de baciloscopia de escarro durante o tratamento, passando de positivo para negativo. O TDO foi implementado no Brasil em 1998, pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT), mas foi descentralizado em 2000, com a expansão do controle para a atenção básica com objetivo de atingir 100% das unidades de saúde dos municípios, algo que ficou somente nos planos desde então. A Figura 3 mostra a porcentagem mundial de novos casos de RR/MDR-TB ao final do ano de 2019. Registraram-se cerca de 206 mil novos casos de RR/MDR-TB ao final desse ano.

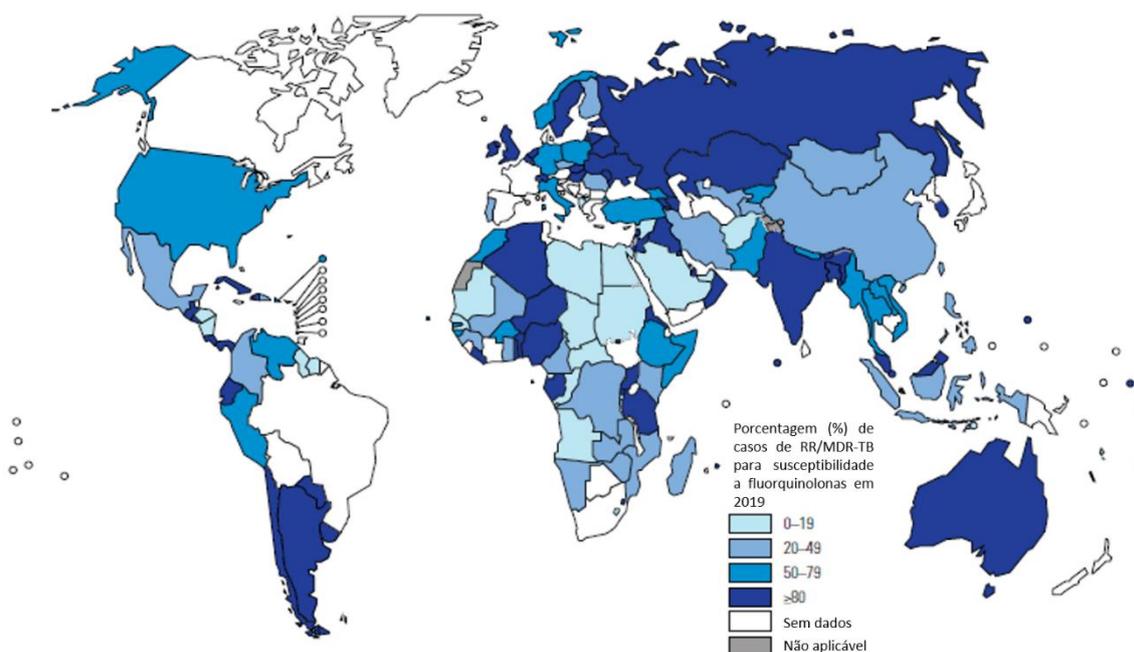


**Figura 3** - Porcentagem de novos casos de RR/MDR-TB em 2019. (WHO, 2020).

Esse valor, na realidade, representa 44% do número total de casos de RR/MDR-TB para esse ano, uma vez que muitos países não realizam testes de suscetibilidade aos fármacos de primeira linha. De acordo com a OMS, estima-se que houve 465 mil novos casos de RR/MDR-TB, em 2019 (WHO, 2020). Destaca-se a divergência de um país como o Brasil (Figura 3), que está entre os 10 países com maior número de incidência, apresentar porcentagem de RR/MDR-TB inferior à dos EUA e do continente Europeu, onde a incidência de novos casos é relativamente bem menor.

A Figura 4 mostra a porcentagem de casos positivos de RR/MDR-TB que foram testados para suscetibilidade a fluorquinolonas. Pode-se observar que o Brasil não possui dados para tal categoria. Um país que apresenta casos subnotificados de RR/MDR-TB e adicionalmente não apresenta dado de detecção de pacientes resistentes a fluorquinolonas (classe de fármaco utilizado no tratamento de segunda linha) explica uma das razões pelas

quais o Brasil se encontra entre os 10 países com maior número de incidência de casos de TB, mesmo fornecendo tratamento de primeira linha para mais de 80% de sua população infectada. No entanto, não se observa a mesma competência em relação à detecção de casos resistentes, como pode-se observar nos casos subnotificados de RR/MDR-TB (Figura 3) além da ausência de dados que comprovariam a presença, ou não, de casos de XDR-TB como mostra a Figura 4.

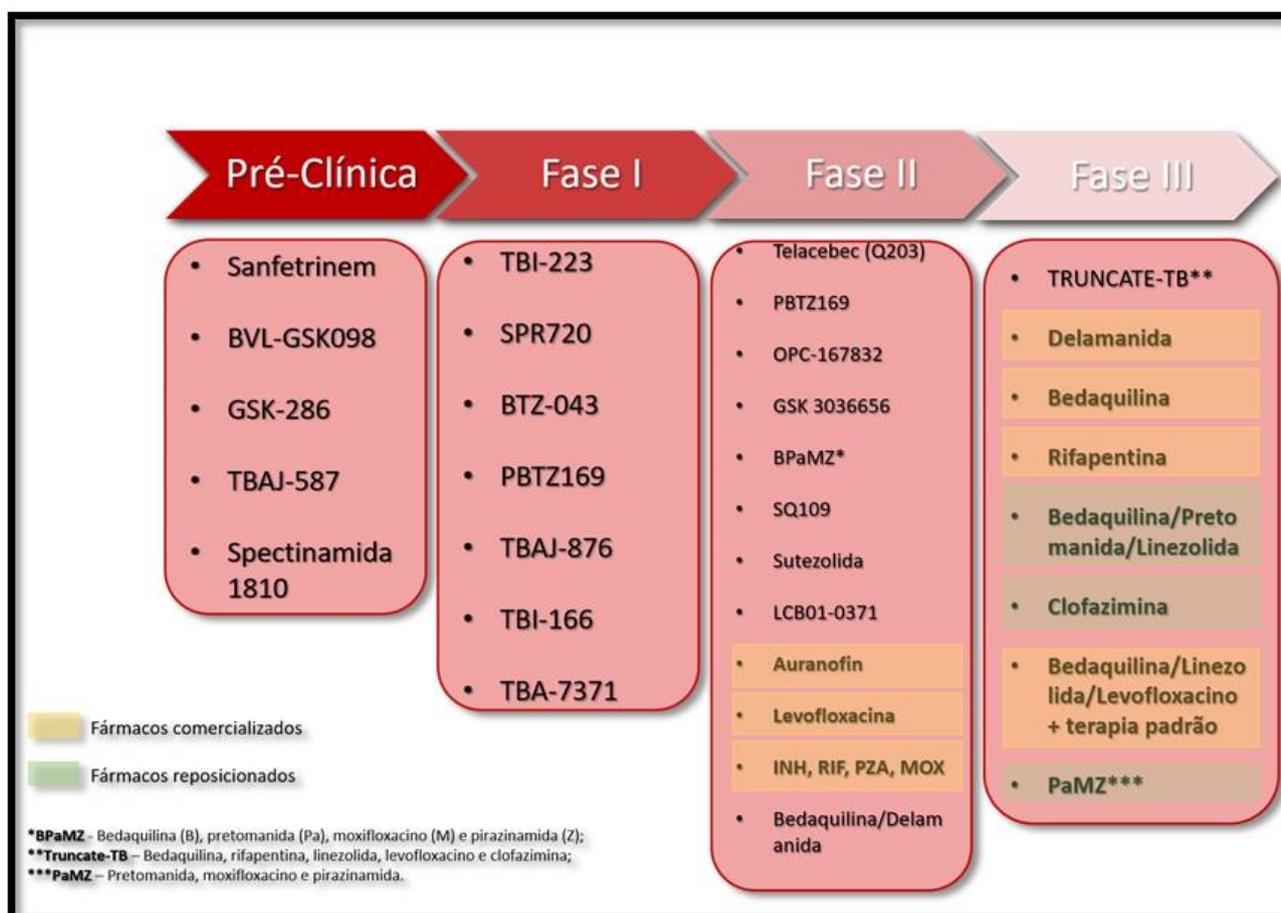


**Figura 4** - Porcentagem de casos de RR/MDR-TB positivos que foram testados quanto à suscetibilidade a fluorquinolonas, em 2019 (WHO, 2020).

### *1.2.2 Novos fármacos e associações para formas resistentes de TB*

Em agosto de 2018, reportaram-se 20 novos candidatos a tuberculostáticos em testes clínicos de fase I, II e III, o que mostra a preocupação mundial em erradicar a TB. A maioria das pesquisas é financiada pelos Estados Unidos (US\$ 1,8 bilhões), seguido de Reino Unido e União Europeia (ambos US\$ 263 milhões cada), embora os demais países não cheguem a US\$ 63 milhões em investimento.

Fármacos como bedaquilina e delamanida já receberam aprovação regulatória acelerada ou condicional com base na avaliação dos resultados de Fase IIb. O reposicionamento de fármacos vem sendo uma alternativa e, dos 20 novos candidatos a fármacos anti-TB, sete fármacos estão sendo reposicionados e testados para o tratamento da TB: clofazimina, linezolida, levofloxacino, moxifloxacino, nitazoxanida, rifampicina (dose elevada) e rifapentina. A Figura 5 mostra a atual situação de novos fármacos, novos candidatos a fármacos, fármacos reposicionados além de novas associações em avanço para o tratamento da TB.



**Figura 5** – Fármacos e potenciais fármacos e associações para o tratamento da TB e suas respectivas fases de estudo. Todos os estudos apresentados encontram-se em andamento (Adaptado de *StopTBPipeline*).

Novos tratamentos e associações estão sendo estudados e testados e esses estudos visam a encontrar novas alternativas, principalmente para o tratamento das formas resistentes de TB (WHO, 2018). Entre eles podem-se destacar:

- endTB: teve seu início em 2017 e compara diversas combinações de novos fármacos ao tratamento difundido pela OMS para MDR-TB. Os regimes testados incluem bedaquilina ou demalanida (ou os dois), moxifloxacino ou levofloxacino, e pirazinamida com adição de linezolida ou clofazimina (ou ambos).
- MDR-END: é um estudo avaliando regime de 9 a 12 meses com a tomada de demalanida, linezolida, levofloxacino e pirazinamida para o tratamento de pacientes com MDR-TB que não tenham resistência a fluorquinolonas.
- NeXT: iniciou-se em 2016, na África do Sul, e tem como objetivo realizar um comparativo entre o regime de 21-24 meses preconizado pela OMS e um regime sem injetáveis, de 6 a 9 meses, contendo bedaquilina, etionamida ou altas doses de isoniazida, linezolida, levofloxacino e pirazinamida em pacientes com MDR-TB.
- TB-PRACTECAL: é um estudo que está em Fase II/III e que visa a avaliar a eficácia e segurança de um regime de 6 meses contendo bedaquilina, pretomanida e linezolida, com adição ou não de moxifloxacino e clofazimina para o tratamento de adultos com MDR-TB ou XDR-TB. Os resultados iniciais demonstram conversão de baciloscopia de escarro em oito semanas e a diminuição de resultados negativos como falha no tratamento ou recidiva, morte ou descontinuação devido a longos tratamentos. Está sendo desenvolvido pela organização humanitária internacional, Médicos sem Fronteiras, e demais colaboradores e implementado na Bielorrússia, África do Sul e Uzbequistão.

### *1.2.3 Reposicionamento de fármacos em Tuberculose*

Estima-se que cerca de 2 a 3 bilhões de pessoas no mundo estejam infectadas com o bacilo na forma latente, isto é, não manifestam a doença, e apenas 5-15% das pessoas infectadas manifestam o bacilo em sua forma ativa. Entretanto, quando a imunidade está comprometida, a TB pode progredir da forma latente para a ativa. Adicionalmente, com o surgimento do HIV, a TB passou de uma doença tratável e controlada para a doença que mais mata pessoas infectadas com HIV no mundo (UNAIDS, 2018). Ante este cenário, fica evidente a necessidade da descoberta de novos fármacos para o tratamento da TB. Contudo, o desenvolvimento de novos compostos é complexo, longo e de alto custo. O tempo médio para o desenvolvimento de um novo composto é de 10-15 anos, com gastos estimados de US\$ 500 milhões a US\$ 2 bilhões. Ainda, vale acentuar que 70% dos compostos bioativos falham na fase pré-clínica devido à toxicidade (FAKUNLE; LORING, 2012).

Utilizando o reposicionamento de fármacos como uma estratégia interessante para o tratamento da TB (BOEREE et al., 2017), surgem “novas velhas” alternativas para inserir fármacos que já foram estudados e aprovados pelos órgãos de regulamentação de medicamentos. Portanto, o reposicionamento é uma técnica que contempla a utilização de um fármaco já conhecido em outro alvo ainda não estudado, isto é, um alvo de ação diferente da indicação terapêutica usual. Dessa forma, o risco de desenvolvimento é menor, visto que os candidatos ao reposicionamento são estruturas conhecidas e estudadas, em geral, com histórico de aplicação em humanos, o que ajudaria no tempo de desenvolvimento do fármaco (ASHBURN; THOR 2004).

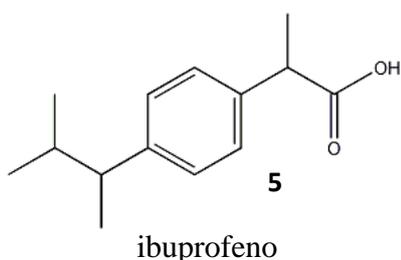
O ibuprofeno (**5**) (Figura 6) e outros ácidos arilpropiónicos possuem diversos alvos em humanos. É comumente conhecido pela inibição da ciclooxigenase 1 e 2 (COX1 e COX2), enzimas responsáveis pela catálise da transformação do ácido araquidônico em

prostaglandinas, que são moléculas essenciais na mediação da resposta inflamatória. No entanto, o IBP é capaz de inibir outros alvos em humanos como a gama-secretase (via não amiloidogênica pela qual se produz a proteína precursora amiloide) (GOLDE, 2013), a subunidade  $\gamma$  do receptor nuclear ativado por proliferadores de peroxissomos (PUHL *et al*, 2015), fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (DAULETBAEV, 2010) e Rho-GTPase (BUSHRA, 2010). Guzman *et al.* (2013) realizaram estudos com ibuprofeno (IBP), fármaco da classe dos anti-inflamatórios não-esteróides, e outros ácidos 2-arilpropiónico e sua atividade tuberculostática. Durante o desenvolvimento deste estudo, realizou-se a identificação das estruturas macromoleculares que interagem com o IBP nas células humanas. Após a identificação da estrutura-alvo, seus aminoácidos foram sequenciados e, posteriormente, comparados para a procura de um homólogo na *M. tuberculosis*. Um dos alvos moleculares do IBP nos humanos é a RHO-GTPase, que possui um homólogo na micobactéria denominado Rv2839c. Este homólogo é uma proteína que pode vir a ser o fator de iniciação de tradução IF-2 (infB), sendo classificado como um componente essencial para iniciação da síntese proteica da bactéria. Neste estudo verificou-se que o IBP foi capaz de inibir completamente o crescimento de cepas de *Mtb* H<sub>37</sub>RV *in vitro* em concentrações acima de 75 mg/L.

Byrnes e colaboradores (2007) realizaram um estudo que verifica a capacidade de diminuição do crescimento de *Mtb* em roedores administrando IBP sozinho, em adição à isoniazida e à pirazinamida. Verificou-se que sozinho IBP não foi capaz de diminuir a contagem bacteriana, no entanto em adição tanto à isoniazida quanto à pirazinamida os resultados foram melhores que os respectivos fármacos sozinhos. No modelo proposto por Byrnes, a rota de infecção dos roedores foi através de aerossóis contendo *Mtb*. Já Vilaplana e colaboradores (2013) verificaram em ensaios *in vivo* a capacidade significativa do IBP

de reduzir tanto as lesões pulmonares dos roedores quanto a carga bacteriana, além de aumentar o tempo de sobrevivência dos animais em que o IBP foi administrado.

Mortensen e colaboradores (2019) acreditam que a divergência entre os resultados de ambos os grupos está relacionada à rota de infecção dos roedores, aerossol (Byrnes *et al*) vs intravenoso (Vilaplana *et al*), uma vez que Mortensen verifica que ao tratar com IBP roedores que foram infectados através de aerossóis a contagem bacteriana aumenta, ao passo que o oposto é verificado quando a rota de infecção dos roedores é através da via intravenosa.



**Figura 6** – Estrutura química do ibuprofeno (5).

### 1.3 Método da latenciação no planejamento de novos fármacos

No âmbito do desenvolvimento de novos fármacos, destaca-se a latenciação, um dos métodos de modificação molecular utilizados. A latenciação tem como principal objetivo a produção de molécula bioativa ou fármaco em forma de transporte inativo, que, conforme sofre processos biológicos ou químicos, libera seu composto ativo para que ele exerça sua ação (CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005; RAUTIO *et al.*, 2008; CHOI-SLEDESKI, WERMUTH, 2015). A latenciação permite, então, que as características farmacêuticas, farmacocinéticas e, indiretamente, as farmacodinâmicas sejam aprimoradas, comparativamente à molécula protótipo.

Os pró-fármacos foram classificados, em 1984, por Wermuth e divididos em:

- ❖ **Pró-fármacos clássicos**, que são os fármacos precursores ligados a um transportador, que os tornam inativos ou menos ativos, uma vez que sofrem reações enzimáticas e/ou químicas, liberando o composto ativo, especialmente, por hidrólise.
- ❖ **Bioprecursores**, também são inativos *in vitro*, mas, ao sofrerem biotransformação, produzem metabólito ativo, sem necessidade de se ligar a transportador, como nos clássicos.
- ❖ **Pró-fármacos mistos** possuem características dos clássicos e dos bioprecursores. Para o transporte do fármaco no local de ação é necessário que o transportador seja metabolizado. Sofre nova biotransformação no local de ação, onde ocorre a liberação do fármaco ativo.
- ❖ **Pró-fármacos recíprocos** são formas latentes em que o transportador possui atividade terapêutica, diferentemente dos pró-fármacos clássicos, promovendo ação sinérgica, por mecanismos similares ou diferentes.
- ❖ **Fármacos dirigidos** correspondem a fármacos ou compostos bioativos ligados a um transportador específico, que irá dirigir o fármaco às células, tecidos ou órgãos, seletivamente, reduzindo os efeitos adversos e toxicidade, por diminuir sua concentração próximo a alvos indesejados (CHUNG et al., 2005).

### *1.3.1. Dendrímeros e Dendrons como transportadores de fármacos/composto bioativos*

A utilização de dendrímeros como transportadores de fármacos é uma aplicação que vem entusiasmando os pesquisadores devido à sua capacidade de conjugar fármaco e

grupo diretor na mesma molécula (KESHARWANI; JAIN; JAIN, 2014). Segundo definição de Fukuda (2018), dendrímeros são macromoléculas podendo ter dimensões tanto nanométricas quanto submicrométricas e que partem de um núcleo central para formar estruturas, homogêneas e monodispersas. Essas macromoléculas podem ser divididas em dendrímeros que possuem estrutura simétrica e bem definida ou podem ser classificados como polímeros hiper-ramificados, que, por sua vez são estruturas semelhantes, mas possuem diferentes tipos de ramificação tornando a macromolécula assimétrica. A estrutura de um dendrímero é dividida em três regiões: **(1)** um núcleo multifuncional; **(2)** camada intermediária formada por ramificações sucessivas, conhecidas como *dendrons*, que servem como proteção do ambiente externo. A cada nova ramificação cria-se uma geração e o número de gerações fica limitado ao impedimento estérico; **(3)** superfície funcionalizada, que pode abrigar diversos grupos funcionais, responsáveis pela interação com o meio externo, além de definir suas características macroscópicas (BELLINI, 2015). Os dendrímeros possuem inúmeras aplicações no campo medicinal e biológico como: agentes de contraste para ressonância magnética, terapia fotodinâmica, aumento da solubilidade, além do transporte de fármacos, entre outros (ARAÚJO et al., 2018; PATEL, 2013; TRIESSCHEIJN et al., 2006; NISHIYAMA et al., 2003; ZHANG et al., 2003; FROEHLING, 2001; TOMALIA, 1986).

As primeiras sínteses dos dendrímeros partiam de um núcleo poliaminado (Figura 7) (PAMAM – poliamidoamina), desenvolvido por Donald A. Tomalia (TOMALIA et al., 1985), denominadas de sínteses divergentes (BELLINI, 2015; KAUR, 2014). A síntese divergente foi desenvolvida por grupos de pesquisa liderados por Tomalia e Newkome e é baseada na construção do dendrímero a partir do foco central multifuncional, no qual são adicionados os dendrons até que toda sua superfície multifuncional esteja ocupada, dando origem a um dendrímero de primeira geração (GONÇALVES, 2012; GIAROLLA, 2012).

Apesar de ser o método mais utilizado pelas indústrias, a metodologia divergente pode levar à formação de estruturas falhas e imperfeitas. Tal fato ocorre em razão de substituições incompletas durante o crescimento da malha dendrímica. No entanto, este processo pode ser corrigido ao adicionar o monômero em excesso para que todas as substituições sejam feitas, dando origem a dendrímeros completos (MALKOCH; GARCIA-GALLEGO, 2020).

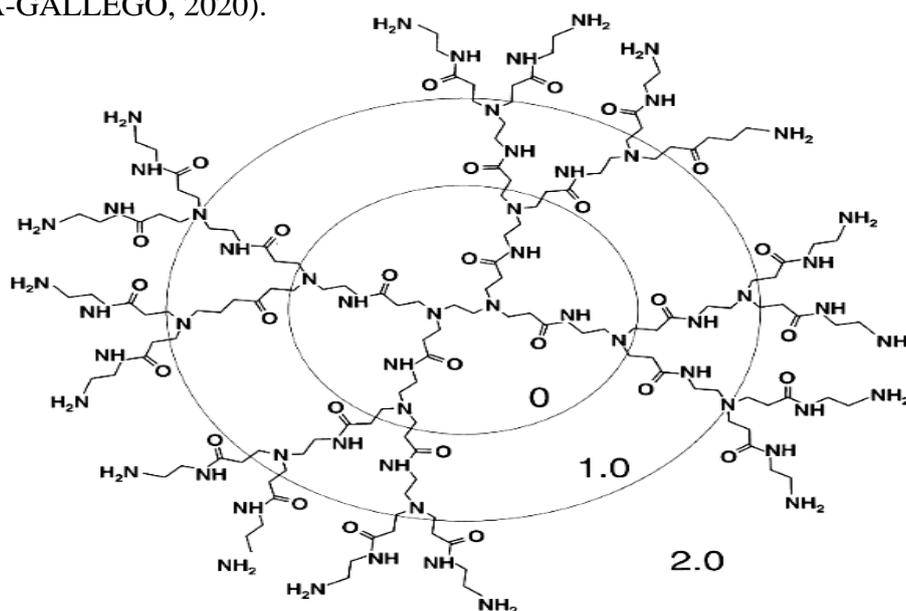
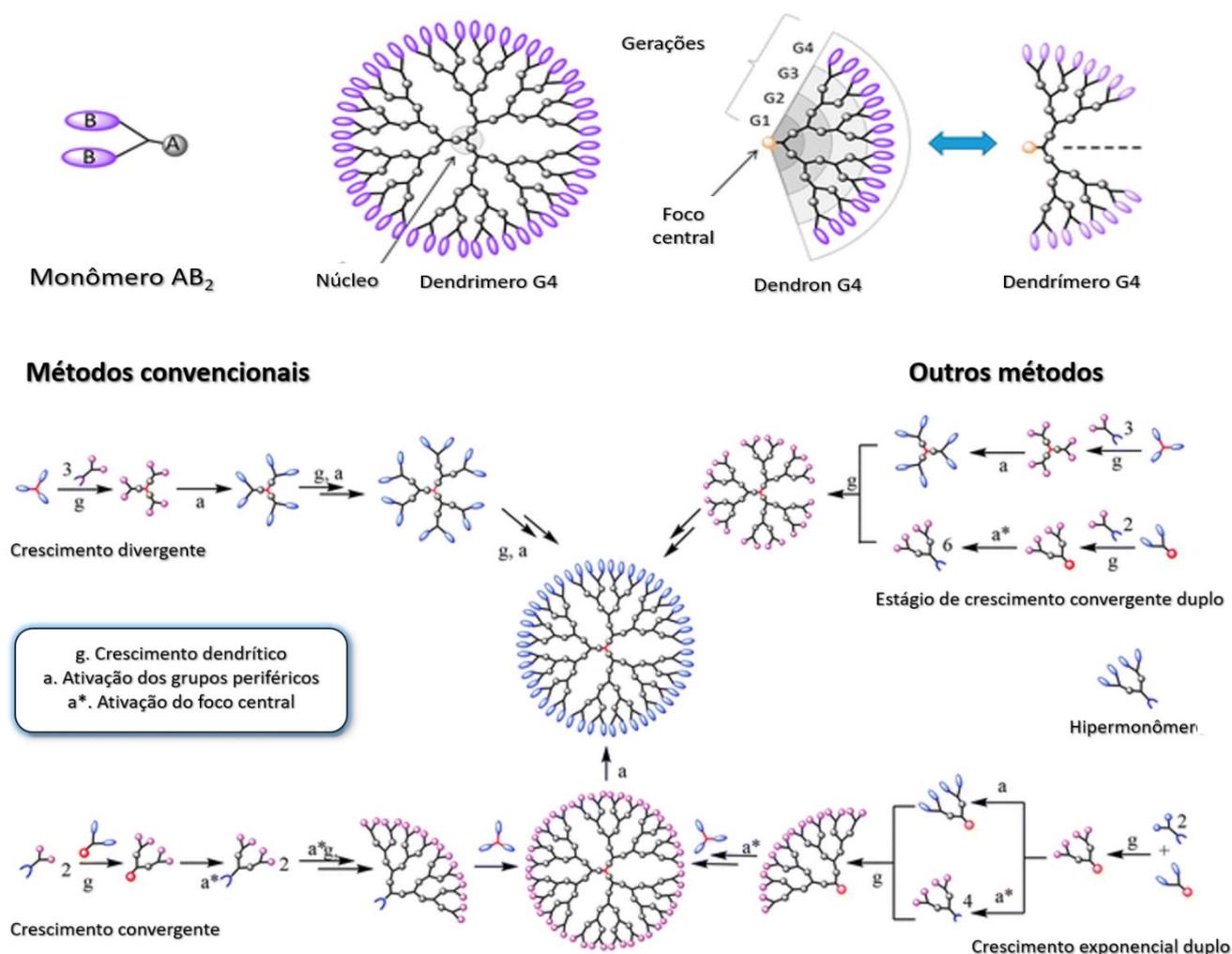


Figura 7 – Dendrímoro PAMAM de 2ª geração (PRUSINER et al., 2003).

A metodologia convergente surgiu para corrigir as falhas nas substituições durante o crescimento da malha dendrímica apresentados pela síntese divergente. Esse método consiste na construção do dendrímoro de fora para dentro e foi realizada por Hawker e Freché (1990). A síntese é iniciada a partir dos dendrons, que são ligados a diversos monômeros, formando a malha dendrímica e a superfície externa funcional. Somente depois é adicionado o foco central, resultando na obtenção de dendrímeros monodispersos, simétricos ou assimétricos, com purificação mais fácil, quando comparado ao método divergente, e alto rendimento. Entretanto, esta técnica se limita a dendrímeros com menos gerações, uma vez que, quanto maior o número de gerações mais difícil fica a inserção dos

dendrons ao núcleo central devido ao impedimento estérico (BELLINI, 2012; WALTER, MICHAEL, 2012; GIAROLLA, 2012, MALKOCH; GARCIA-GALLEGO, 2020).

A Figura 8 apresenta os blocos de construção dos dendrímeros e os dois métodos de síntese mais utilizados.



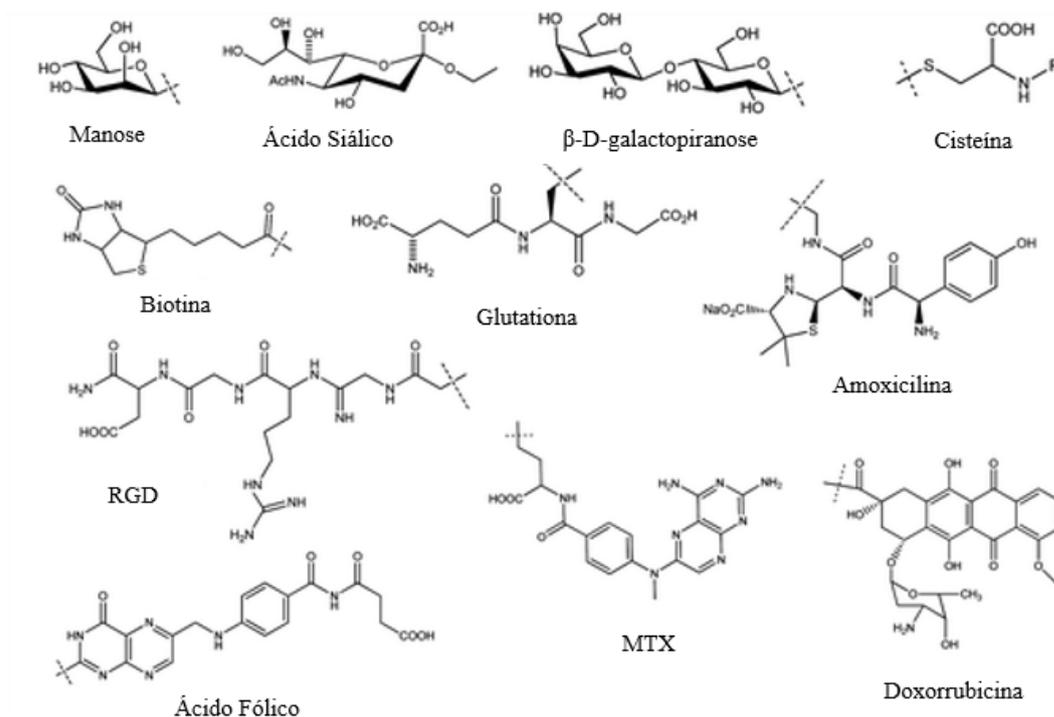
**Figura 8** – Componentes estruturais dos dendrímeros, dendrons e seus principais métodos de síntese (Adaptado de MALKOCH, 2020).

A capacidade dos dendrímeros em serem utilizados como transportadores dirigidos os tornam alvos de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos seletivos, incluindo os tuberculostáticos. Ao dirigir o fármaco diretamente para onde o

bacilo está alojado, os efeitos adversos irão decair, seja pelo efeito direcionado ou pela diminuição da dose (KESHARWANI; JAIN; JAIN, 2014).

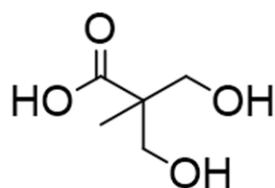
Apesar de ser uma tecnologia promissora, os dendrímeros apresentaram em diversos estudos certa toxicidade dependente da dose e do número de gerações. Estudos demonstraram que dendrímeros PAMAM podem provocar hemólise devido a interação de aminas livres catiônicas da superfície funcionalizada com as hemácias (LUONG *et al.*, 2016). Portanto, quanto maior o número de gerações, maior a probabilidade de a molécula ser tóxica às células humanas (MUKHERJEE *et al.*, 2010; JAIN *et al.*, 2010), restringindo, assim, o número de gerações para aplicação na área biomédica.

Polímeros dendríticos, ou dendrons, contendo ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)propiônico (*bis*-MPA) foram introduzidos por Hult *et al.*, por volta de 1990, e hoje fazem parte de uma das classes mais estabelecidas de polímeros dendríticos. Os dendrons são uma alternativa viável para substituir os dendrímeros PAMAM, principalmente devido a recentes estudos demonstrando a pouca estabilidade desses derivados, quando armazenados, além da alta toxicidade. A excelente monodispersão apresentada pelos dendrons *bis*-MPA levou à sua utilização como polímeros de precisão para diversas aplicações, por exemplo, como transportadores de fármacos e grupos diretores (Figura 9) (STENSTRÖM *et al.*, 2016; CARLMARK *et al.*, 2013). Ademais, a utilização de dendrons no lugar de dendrímeros fornece a mesma possibilidade de transporte de moléculas com processo de síntese mais viável.



**Figura 9** – Exemplo de compostos bioativos e grupos diretores previamente acoplados à polímeros de *bis*-MPA (Adaptado de CARLMARK *et al.*, 2013)

O *bis*-MPA (**6**) (Figura 10) é molécula alifática simples, pró-quiral, com massa molecular de 134,06, contendo duas hidroxilas e um grupo carboxílico. Apesar de sua estrutura simples, o *bis*-MPA possui diversas aplicabilidades na síntese de polímeros dendríticos, variando a obtenção de dendrons e dendrímeros monodispersos até polímeros hiper-ramificados polidispersos e polímeros dendríticos híbridos lineares (CARLMARK, *et al.*, 2013).



*bis*-MPA (**6**)

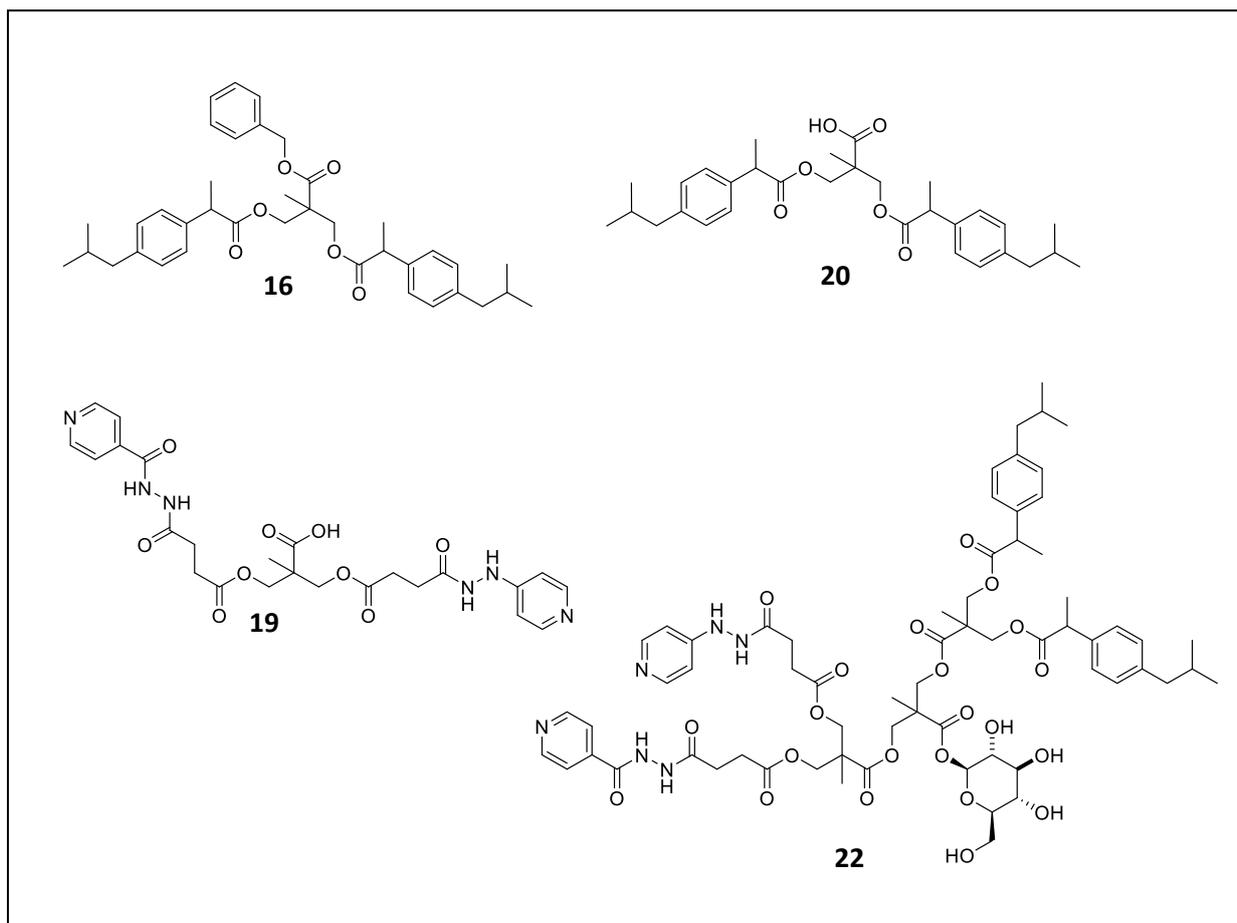
**Figura 10** – Estrutura química do ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiónico (*bis*-MPA) (**6**).

### 1.3.2 Manose como grupo diretor em dendrímeros dirigidos

Entre os vários grupos diretores para fármacos dirigidos/dendrímeros dirigidos, a manose é utilizada com vistas a dirigir a ação para macrófagos. O receptor de manose (MR, CD206 ou MRC1) é uma glicoproteína transmembrana da família dos receptores de lectina tipo C e é um alvo interessante no direcionamento de fármacos tuberculostáticos (TAYLOR, 2005), entre outros. O CD206 é primariamente expresso na superfície de macrófagos e células dendríticas imaturas. Os receptores de manose também podem ser encontrados na forma solúvel na circulação periférica após processo de clivagem proteolítica da superfície dos macrófagos (SUZUKI *et al.*, 2018). O receptor da manose tem um papel importante na homeostasia devido à capacidade de se ligar a manoses não desejadas no organismo, além de iniciar a sua eliminação da corrente sanguínea. Muitos patógenos contêm manose em sua estrutura, fazendo com que o MR do macrófago reconheça esses patógenos (AZAD, 2014). Patógenos intracelulares, como *M. tuberculosis*, que, ao serem endocitados iniciam seu processo de proliferação “aproveitam” do mecanismo de reconhecimento dos MR para conseguir alcançar o interior celular dos macrófagos. Da mesma forma foi utilizado esse mecanismo de reconhecimento para fundamentar um possível direcionamento do pró-fármaco proposto. Essa estratégia permitiria a liberação do candidato a pró-fármaco no interior dos macrófagos onde ocorre a multiplicação da *Mtb*, que por sua vez aumentaria sua eficácia e diminuiria os efeitos adversos (TAYLOR, 2005; ALLAVENA, 2004).

## 2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Apesar de ser considerada uma doença tratável e controlada, a erradicação da TB continua sendo um desafio para saúde pública mundial, principalmente nos países mais pobres, onde a incidência da doença é maior, quando comparado aos países desenvolvidos. Assim, tendo em vista a necessidade de novos fármacos que evitem o abandono ao tratamento, devido aos efeitos adversos, e, especialmente, a resistência, e considerando a importância crescente dos dendrons/dendrímeros no transporte de fármacos/compostos bioativos, o objetivo inicial deste trabalho foi desenvolver pró-fármaco e fármaco dirigido com manose como grupo diretor. Estes foram planejados como derivados de dendron de *bis*-MPA, com associação de isoniazida e ibuprofeno, para os pró-fármacos, e com a adição de manose, para o fármaco dirigido (Figura 11). Ressalta-se que a ação sinérgica destes dois fármacos (ibuprofeno e isoniazida) se mostrou eficaz, como descrito por Byrne (2007), Guzman (2013) e Vilaplana (2013). Este sistema seria capaz de atuar por dois mecanismos diferentes, com efeito sinérgico diminuindo o tempo de tratamento. Ademais, além da seletividade de ação, a adição da manose com intuito de direcionamento resultaria em diminuição da dose. Desta forma, como resultado da diminuição da dose, eventualmente, haveria menos efeitos adversos, resultando em menor taxa de abandono do tratamento. Vale mencionar que se espera, também, que haja prolongamento da ação, uma vez que pelo planejamento, as moléculas deveriam ter liberação gradual do dendron, o que será avaliado, posteriormente, por estudos de liberação por meio de CLAE. Primeiramente, foi obtido o *bis*-MPA com ácido carboxílico protegido (**12**) e funcionalização da isoniazida. Posteriormente, acoplou-se o ibuprofeno (**5**) ao *bis*-MPA protegido (**12**)



**Figura 11** – Derivados planejados como potenciais tuberculostáticos: GLC24 (**16**), dendron de IBP desprotegido (**20**), dendron de INH desprotegido (**19**) e dendron de 2<sup>a</sup> geração misto (**22**).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Solventes e reagentes

Os solventes utilizados foram secados e purificados previamente segundo técnicas descritas em Armarego e Chai (2009). O ibuprofeno em questão foi adquirido através de uma doação feita pelo laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica (DEINFAR) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, e foi previamente analisado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)
- 4-dimetilaminopiridina (DMAP)
- acetato de etila (EtOAc)
- acetona
- acetonitrila (ACN)
- ácido 2,2-*bis*(hidroximetil)propiónico (*bis*-MPA)
- ácido acético glacial
- ácido bromídrico (HBr)
- ácido clorídrico (HCl)
- anidrido succínico
- bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ )
- brometo de benzila
- clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ )
- clorofórmio-d ( $\text{CDCl}_3$ )
- cloreto de sódio (NaCl)
- cloreto de oxalila ( $\text{COCl}_2$ )
- cloreto de tionila ( $\text{SOCl}_2$ )
- 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (DBU)
- diclorometano (DCM)

- dimetilformamida (DMF)
- dimetilsulfoxido-d6 (DMSO-d6)
- hidróxido de sódio (NaOH)
- ibuprofeno (IBP)
- isoniazida (INH)
- piridina (Py)
- sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- trietilamina (Et<sub>3</sub>N)

### 3.2 Métodos de análise

#### 3.2.1 Ponto de fusão

O ponto de fusão (p.f.) foi determinado utilizando aparelho capilar de marca Büchi modelo M-560.

#### 3.2.2 Espectrometria de ressonância magnética (RMN)

A obtenção de espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e RMN 2D (COSY, HMQC e HMBC) foi realizada em Espectrômetro Bruker 300 para <sup>1</sup>H e 75 Mhz para <sup>13</sup>C modelo Advanced DPX-300 (Departamento de Farmácia - FCF/USP). As amostras analisadas foram dissolvidas em solventes deuterados adequados, os quais foram utilizados sem tratamento prévio. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram designados em ppm a partir do deslocamento do solvente sem deutério. A multiplicidade dos sinais foi colocada em parênteses (s = simpleto, sl = simpleto largo, d = duplete, dd = duplo duplete, ddd = duplo duplo duplete, t = tripleto, dt = duplo tripleto, td = triplo duplete, tt = triplo tripleto, q = quarteto, quint = quinteto, m = multiplete). Já o número de hidrogênios foi deduzido a partir da integração relativa e a constante de acoplamento (*J*) está expressa em Hertz (Hz).

### *3.2.3 Espectrometria no Infravermelho (IV)*

A análise no IV foi realizada por ATR (Attenuated Total Reflectance) em espectrofotômetro FTIR IR Affinity-1 Shimadzu, da Central Analítica do Departamento de Farmácia, FCF-USP.

### *3.2.4 Cromatografia em camada delgada (CCD)*

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas com cromatoplasmas de sílica-gel G-60, marca Merck, com as fases móveis apropriadas. Para revelação, empregaram-se luz ultravioleta e solução reveladora de verde de bromocresol.

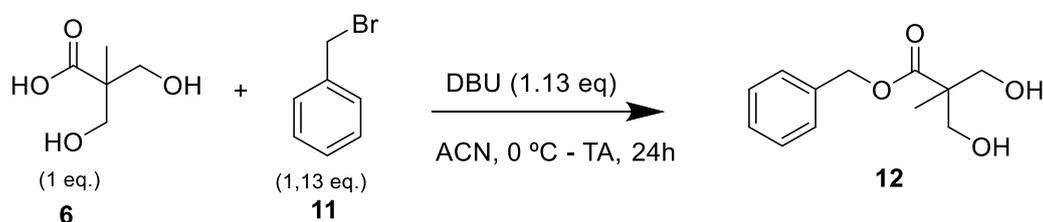
### *3.2.5 Cromatógrafo automático flash Isolera™ Prime, Biotage*

A purificação por cromatografia em coluna de sílica foi realizada em aparelho Isolera™ Prime, Biotage, no equipamento disponível na Central Analítica do Departamento de Farmácia, FCF-USP. Utilizou-se sílica mesh 200 para o preenchimento da coluna e eluentes adequados.

### 3.3 Procedimentos experimentais

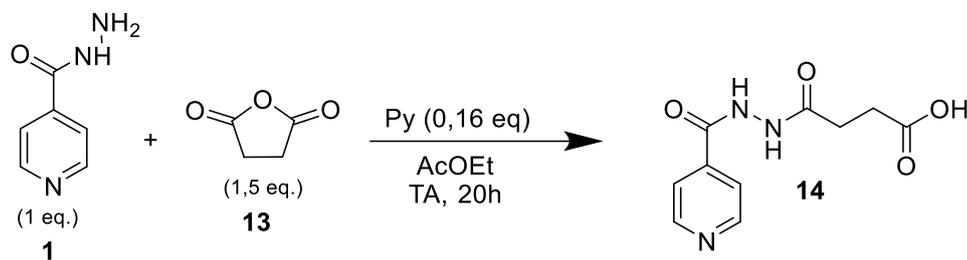
#### 3.3.1 Síntese do ácido 2,2-bis(hidroximetil)propiônico (bis-MPA) protegido

(adaptado de COADY et al., 2014; GONZAGA, 2017)



Em um balão de fundo redondo de 250 mL de uma boca adicionaram-se 40 mL de acetonitrila e, subsequentemente, adicionou-se *bis*-MPA (**6**) (1 eq; 15 mmol; 2,0 g) e DBU (1,13 eq; 17 mmol; 2,5 mL) em banho de gelo, seguido da adição de brometo de benzila (**11**) (1,13 eq; 17 mmol; 2 mL), gota a gota. A reação foi mantida sob agitação durante 24 h em temperatura ambiente (TA). A reação foi acompanhada por CCD (Rf 0,53; hexano:acetato de etila, 1:3 como eluente). O solvente foi removido sob pressão reduzida a 50 °C. Após essa etapa, o resíduo reacional foi diluído em acetato de etila (100 mL) e a extração foi feita duas vezes com água (2x100 mL). As fases orgânicas separadas foram reunidas e lavadas com solução saturada de NaCl (2x100 mL) e secadas com sulfato de sódio anidro. O resíduo obtido após filtração foi recristalizado em tolueno, fornecendo o *bis*-MPA com ácido carboxílico protegido (*bis*-MPAp) (**12**) como um sólido branco em 60% de rendimento (2,012 g; 8,97 mmol). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ : 7,35 (s, 5H), 5,21 (s, 2H), 3,93 (dd,  $J_{H_a - H_b} = 11,1$  Hz;  $J_{H_a - H_{OH}} = 5,9$  Hz, 2H), 3,74 (dd,  $J_{H_b - H_a} = 11,3$  Hz;  $J_{H_b - H_{OH}} = 5,4$  Hz, 2H), 2,80 (t,  $J_{OH} = 5,9$  Hz, 2H) 1,08 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ : 174,7, 134,6, 127,6, 127,3, 126,8, 76,4, 76,0, 75,5, 67,3, 65,7, 48,2, 160. P.f.:72,5 – 74,1 °C.

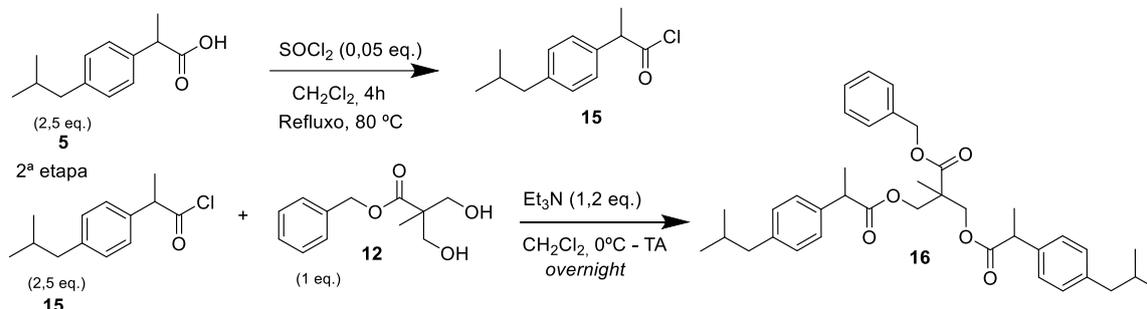
3.3.2 Síntese do hemissuccinamida de isoniazida (YEOH et al., 2013; SANTOS, 2016)



Em um balão de fundo redondo de 250 mL de uma boca, colocaram-se 70 mL de acetato de etila e adicionou-se anidrido succínico (1,5 eq; 1,5 mmol; 0,15 g), seguido de piridina (0,16 eq; 0,16 mmol; 0,009 mL) e, por último, a isoniazida (**1**) (1 eq; 1 mmol; 0,13 g). Manteve-se a reação em TA e agitação constante por 20 horas. A reação foi acompanhada por CCD (AcOEt:MetOH, 8:2 como eluente). Após esse período, o solvente foi removido por pressão reduzida e aquecimento (40 °C). A purificação do produto foi feita através de recristalização em etanol. Após a recristalização com etanol obteve-se o produto (**14**) como sólido branco com 55% de rendimento (0,12 g; 0,5 mmol). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: 11,80 (s, 1H), 10,64 (s, 1H), 10,04 (s, 1H), 8,77 (s, 2H), 7,78 (s, 2H), 2,49 (s, 4H). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm) δ: 173,4, 170,4, 163,8, 150,3, 139,4, 121,2, 40,3, 40,0, 39,7, 39,4, 39,2, 38,9, 38,6, 28,7, 28,1. P.f.: 219,3 °C – 221,5 °C.

### 3.3.3 Síntese dos dendrons utilizando os respectivos cloretos de ácido

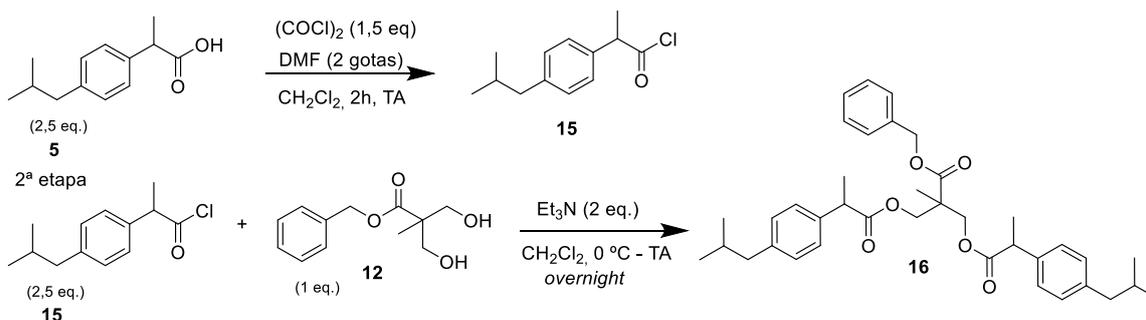
#### 3.3.3.1 Síntese do dendron de ibuprofeno utilizando cloreto de tionila como agente conversor (YADAV *et al.*, 2006; CAPIM *et al.*, 2013)



Em um balão de fundo redondo de duas bocas de 250 mL diluiu-se ibuprofeno (**5**) (2,5 eq.; 5 mmol; 1,03 g) em 15 mL de diclorometano e adicionou-se gota a gota cloreto de tionila ( $\text{SOCl}_2$ ) (0,05eq.; 0,28 mmol; 2 mL). Após adição, colocou-se a reação sob refluxo a 40 °C e agitação durante 4 horas. Em seguida, o excesso de  $\text{SOCl}_2$  foi removido por destilação. O excesso remanescente de  $\text{SOCl}_2$  foi removido por pressão reduzida. O produto concentrado sem prévia purificação foi diluído em 5 mL de DCM e o conteúdo resfriado à TA onde subsequentemente adicionou-se gota a gota o *bis*-MPAP (**12**) (1 eq.; 2 mmol; 0,45 g) diluído em 5 mL de DCM. Em seguida, também gota a gota, adicionou-se  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,2 eq.; 6 mmol; 0,83 mL) ao conteúdo reacional. A reação foi mantida sob agitação e atmosfera  $\text{N}_2$  durante 12h. O acompanhamento da reação foi feito através de CCD (Rf 0,73; hexano:acetato de etila, 7:3 como eluente). O solvente foi removido por pressão reduzida e o produto foi obtido como líquido de característica viscosa e coloração amarela. Sua purificação foi realizada através do cromatógrafo automático utilizando como eluente hexano:acetato de etila, 7:3.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 7,15 (d,  $J = 21,2$  Hz, 3H), 7,04 – 6,85 (m, 4H), 5,18 – 4,72 (m, 2H), 4,32 – 3,83 (m, 2H), 3,65 – 3,32 (m, 1H), 2,31 (d,  $J = 6,8$  Hz, 2H), 1,71 (sept,  $J = 13,5, 6,7$  Hz, 1H), 1,31 (d,  $J = 7,4$  Hz, 3H), 0,88 (t,  $J = 11,1$  Hz, 3H), 0,77 (d,  $J = 6,5$  Hz, 9H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 172,8,

171,3, 139,5, 136,3, 134,5, 128,2, 127,4, 127,2, 126,9, 126,1, 76,5, 76,1, 75,6, 65,5, 64,3, 64,2, 64,2, 64,1, 52,3, 45,4, 43,9, 29,0, 21,3, 16,8, 16,3.

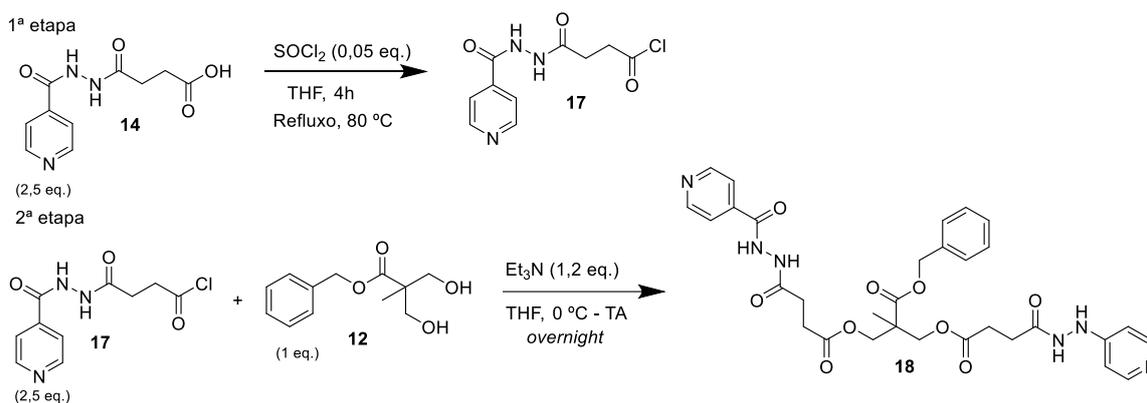
### 3.3.3.2 Síntese do dendron de ibuprofeno utilizando cloreto de oxalila como agente conversor (WANG *et al.*, 2017)



Em um balão de fundo redondo de 250 mL de uma boca foi introduzido ibuprofeno (**5**) (2,5 eq.; 5 mmol; 1,03 g) seguido de 5 mL de DCM. Adicionou-se gota a gota, cloreto de oxalila (COCl)<sub>2</sub> (1,5 eq.; 7,5 mmol; 0,64 mL) seguido de 2 gotas de DMF. Manteve-se a reação sob agitação em TA por 2 horas. Os solventes e reagentes remanescentes foram removidos sob pressão reduzida. Em seguida, reduziu-se a temperatura da reação para 0 °C e adicionou-se gota a gota a solução de *bis*-MPAp (**12**) (1 eq.; 2 mmol; 0,45 g) em 5 mL de DCM. Por último, também gota a gota, adicionou-se Et<sub>3</sub>N (2 eq.; 10 mmol; 1,4 mL) e o banho de gelo foi removido, mantendo-se a reação sob agitação à TA por 12 horas. A reação foi acompanhada por CCD (Rf 0,8 hexano:acetato de etila, 7:3). Após o término da reação o conteúdo do balão (suspensão) foi diluído em DCM. Essa solução foi submetida a filtração através de uma pequena coluna de sílica-gel. O conteúdo filtrado foi concentrado por pressão reduzida e purificado através do cromatógrafo automático utilizando como eluente hexano:acetato de etila, 7:3. Após purificação, o produto (**16**) foi obtido como líquido viscoso incolor com rendimento de 40,5% (0,5 g; 0,81 mmol). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ: 7,44 – 7,22 (m, 5H), 7,21 – 7,04 (m, 8H), 5,10 – 4,93 (m, 2H), 4,33 – 4,01 (m, 4H), 3,65 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,46 (d, *J* = 7,1 Hz, 4H) 1,87 (sept,

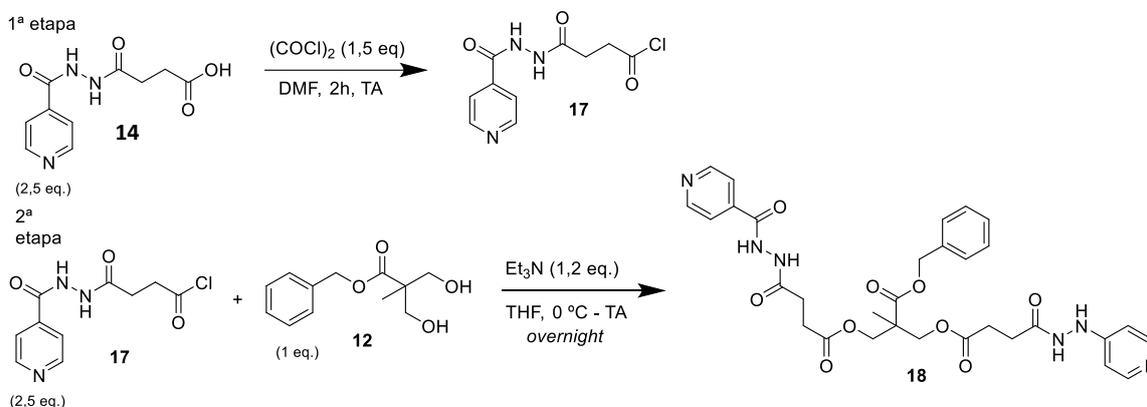
$J = 13,4, 6,6$  Hz, 2H), 1,47 (d,  $J = 7,1$  Hz, 4H), 1,03 (s, 3H), 0,92 (d,  $J = 6,6$  Hz, 12H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta$ : 173,4 171,9, 140,1, 136,9, 135,1, 128,8, 128,0, 127,7, 127,5, 126,7, 66,1, 64,8, 46,0, 44,5, 29,6, 17,4, 16,9.

### 3.3.3.3 Síntese do dendron de hemissuccinamida de isoniazida utilizando cloreto de tionila como agente conversor (YADAV *et al.*, 2006; CAPIM *et al.*, 2013)



Em um balão de fundo redondo de duas bocas de 250 mL diluiu-se a hemissuccinamida de isoniazida (**14**) (2,5 eq.; 5 mmol; 1,2 g) em 15 mL de THF e adicionou-se gota a gota o cloreto de tionila ( $\text{SOCl}_2$ ) (0,05 eq.; 0,28 mmol; 2 mL). Após adição, colocou-se a reação sob refluxo a 65 °C e agitação durante 4 horas. Em seguida, o excesso de  $\text{SOCl}_2$  foi removido por destilação. O excesso remanescente de  $\text{SOCl}_2$  foi removido por pressão reduzida. O produto concentrado sem prévia purificação foi diluído em 15 mL de THF e o conteúdo resfriado à TA, adicionando-se, subsequentemente, gota a gota o *bis*-MPAp (**12**) (1 eq.; 2 mmol; 0,45 g) diluído em 5 mL de THF. Em seguida, também gota a gota, adicionou-se  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,2 eq.; 6 mmol; 0,83 mL) ao conteúdo reacional. A reação foi mantida sob agitação e atmosfera  $\text{N}_2$  por 12 horas. Quando a reação foi interrompida, verificaram-se indícios de degradação do produto.

3.3.3.4 Síntese do dendron de hemissuccinamida de isoniazida utilizando cloreto de oxalila como agente conversor (WANG *et al.*, 2017)

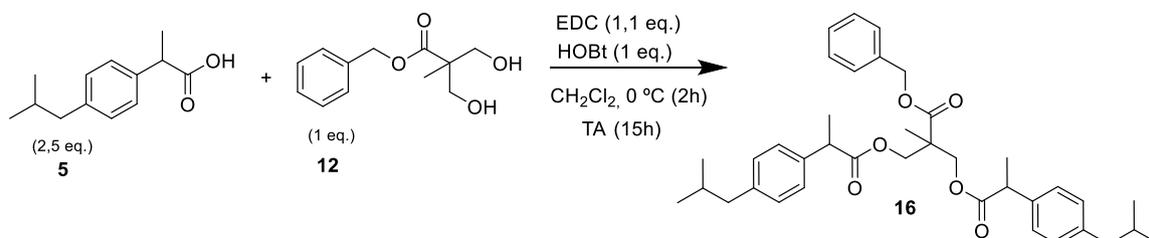


Em um balão de fundo redondo de 250 mL de uma boca foi introduzido hemissuccinamida de isoniazida (**14**) (2,5 eq.; 5 mmol; 1,2 g) seguido de 10 mL de DMF. Adicionou-se gota a gota, cloreto de oxalila  $(\text{COCl})_2$  (1,5 eq.; 7,5 mmol; 0,64 mL). Manteve-se a reação sob agitação em TA por 2 horas. Os solventes e reagentes remanescentes foram removidos sob pressão reduzida. Em seguida, reduziu-se a temperatura da reação para 0 °C e adicionou-se gota a gota a solução de *bis*-MPAp (**12**) (1 eq.; 2 mmol; 0,45 g) em 5 mL de THF. Por último, também gota a gota, adicionou-se  $\text{Et}_3\text{N}$  (2 eq.; 10 mmol; 1,4 mL) e o banho de gelo foi removido, mantendo-se a reação sob agitação a TA por 12 horas. A reação foi acompanhada por CCD (acetato de etila:metanol, 8:2). Após o término da reação, o conteúdo do balão (suspensão) foi diluído em THF. Não foi possível realizar a extração do produto bem como sua purificação.

### 3.3.4 Síntese dos dendrons utilizando EDC ou DCC como agentes condensantes

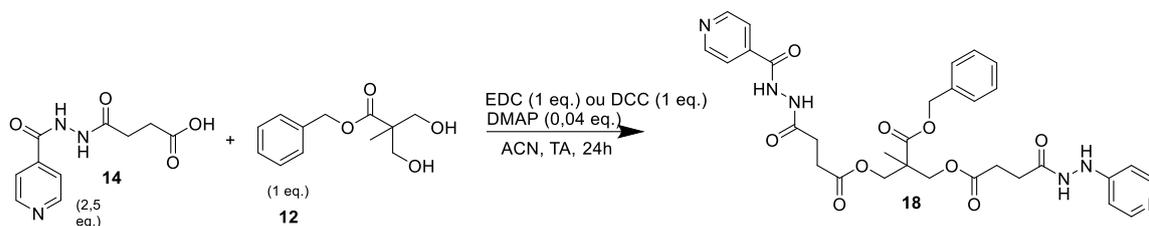
#### 3.3.4.1 Síntese do dendron de ibuprofeno utilizando EDC como agente condensante

(BOGER et al., 2004)



Em um balão de fundo redondo de 250 mL de uma boca colocou-se ibuprofeno (**5**) (2,5 eq.; 5 mmol; 1,03 g), seguido da adição de 5 mL de DCM. O balão contendo a solução de ibuprofeno foi mantido sob agitação e submetido a temperatura de 0 °C no qual, posteriormente, adicionou-se EDC (1.1 eq; 5,5 mmol; 1,04 g). A formação do éster reativo foi acompanhada por CCD (hexano:acetato de etila, 7:3). Quando a mancha de R<sub>f</sub> 0,6 referente ao ibuprofeno foi totalmente consumida para formação do éster reativo, adicionou-se HOBt (1 eq.; 5 mmol; 0,78 g) diluído em 20 mL de DCM. Posteriormente, adicionou-se, gota a gota, solução de *bis*-MPAp (**12**) (1 eq.; 2 mmol; 0,45 g) diluído em 5 mL de DCM. A reação foi mantida sob agitação a 0 °C, por 2 h, e posteriormente, a temperatura foi aumentando gradativamente até atingir a TA, na qual permaneceu sob agitação por mais 15 h. O produto obtido apresentou rendimento irrisório (<15%) de produto líquido pouco viscoso amarelado. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ: 7,47 – 7,20 (m, 5H), 7,19 – 6,99 (m, 8H), 5,31 – 4,89 (m, 2H), 4,42 – 3,95 (m, 4H), 3,67 – 3,56 (m, 2H), 2,45 (d, *J* = 6,8 Hz, 4H), 1,86 (hept, *J* = 13,3, 6,6 Hz, 2H), 1,45 (d, *J* = 7,3 Hz, 6H), 1,02 (s, 3H), 0,91 (d, *J* = 6,5 Hz, 12H). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, ppm) δ: 172,7, 171,3, 139,4, 136,3, 134,5, 128,2, 127,4, 127,1, 126,9, 126,1, 65,5, 64,2, 52,3, 45,4, 43,9, 29, 21,3, 16,8, 16,3.

### 3.3.4.2 Síntese do dendron de hemissuccinamida de isoniazida utilizando EDC ou DCC como agentes condensantes (DEPRÉ et al., 2016)



Em um balão de fundo redondo de 250 mL de uma boca adicionaram-se hemissuccinamida de isoniazida (**14**) (2,5 eq.; 2,5 mmol; 0,6 g) seguida de 50 mL de acetonitrila e posterior adição de DCC (1 eq.; 2,5 mmol; 0,515 g) ou EDC (1 eq.; 2,5 mmol; 0,483 g) e manteve-se sob agitação. Após 10 minutos, adicionou-se 0,1 mmol de DMAP (0,04 eq; 0,1 mmol; 0,012 g), deixando-se sob agitação em TA por 30 minutos. Adicionou-se, em seguida, ao conteúdo reacional *bis*-MPAp (**12**) (1 eq.; 1 mmol; 0,224 g). Manteve-se a reação sob agitação constante a TA, por 24 horas. Subsequentemente, o produto foi concentrado sob pressão reduzida e a purificação foi efetuada em coluna cromatográfica automática, usando o sistema eluente acetato de etila:metanol (7:3 v/v). Na reação utilizando DCC como agente condensante, após o término da reação o conteúdo do balão foi filtrado e o solvente remanescente foi evaporado sob pressão reduzida. Para maior remoção do subproduto de DCU o precipitado foi diluído em diclorometano e reprecipitado em hexano gelado, novamente, por três vezes. O produto não foi obtido em ambas as condições reacionais.

### 3.4 Métodos de avaliação da atividade biológica

Os estudos de atividade biológica foram realizados pelo Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Regina D'Imperio-Lima. A cepa *Mtb* M299 foi providenciada pela Prof. Dr. Elena Lassounskaia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

#### 3.4.1 Cultivo micobacteriano

A manipulação e cultivo das micobactérias obedeceu às normas de biossegurança de nível III e os experimentos foram realizados no Laboratório NB3 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Utilizaram-se três cepas micobacterianas de diferentes níveis de virulência: *M. tuberculosis* H37Rv (cepa laboratorial padrão), *M. tuberculosis* M299 (isolado clínico hipervirulento de humano) e *M. bovis* MP287/03 (isolado clínico hipervirulento de bovino). As cepas foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI), acrescido de 0,05% Tween 80, suplementado com 10% de ADC (albumina, dextrose, catalase - Difco Laboratories), durante 7 dias até a fase mid-log, em estufa bacteriológica a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O monitoramento do crescimento micobacteriano foi efetuado através da mensuração de densidade óptica (D.O 600 nm), por espectrofotometria (Biochrom, modelo Libra S6). Alíquotas de 1 mL (10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> bactérias) foram retiradas para estoque e acondicionadas em freezer a -70 °C. Para realização dos ensaios biológicos, as culturas micobacterianas criopreservadas foram descongeladas e mantidas em meio líquido 7H9 suplementado, por 7 dias, em constante agitação e sonicação em banho de ultrassom (Ultrasonic Maxi cleaner 800–UNIQUE) por 1 min para dispersão dos grumos. O ajuste da concentração bacteriana a ser utilizada nos experimentos foi realizado através da leitura +600 nm, subtraído da D.O

do meio de cultura 7H9 somente suplementado. Posteriormente, a diluição da suspensão micobacteriana obedeceu ao critério de relação da densidade óptica versus número de bacilos (D.O 0,100 X  $2 \times 10^7$  bacilos/mL) para as cepas *Mtb* H37Rv e M299 e (D.O 0,100 X  $10^8$  bacilos/mL) para a cepa *Mbv* MP287/03.

#### 3.4.2 Atividade antimicobacteriana

Para os ensaios da atividade antimicobacteriana, a suspensão de micobactérias ( $3 \times 10^7$  CFU/mL) foi plaqueada ( $1 \times 10^6$  CFU/mL) e, posteriormente, as amostras obtidas foram diluídas em meio 7H9 suplementado, nas concentrações de 125, 62,5, 31,2 e 15,6  $\mu\text{g/mL}$ . Após 7 dias de cultivo com as amostras, adicionaram-se 10  $\mu\text{L}$  da solução de MTT a cada poço da placa e, após 3 horas, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (20% p/v de SDS, 50% v/v de DMF, Sigma Aldrich) por 18 h. A densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro de placa (Dynatech MR5000) a 570 nm. Como controle negativo de crescimento utilizou-se apenas meio de cultura 7H9 suplementado e como controle positivo de crescimento utilizaram-se as suspensões micobacterianas de cada cepa não tratada. Além disso, a capacidade inibitória das amostras foi comparada ao tratamento com rifampicina, um dos fármacos padrão para tratamento da TB. A isoniazida também foi utilizada, mas esta foi sintetizada pelo nosso grupo. A rifampicina foi utilizada na concentração de 25, 12,5, 6,2, 3,1, 1,5 e 0,7  $\mu\text{g/mL}$  para todas as cepas.

#### 3.4.3 Cultivo celular

As linhagens celulares de macrófagos RAW 264.7 e células Vero (células epiteliais de rim de macaco africano), obtidas da ATCC (VA, USA), foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% SFB. Para os experimentos, as linhagens foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL, 24 h antes do tratamento com as amostras obtidas, utilizando meio DMEM-F12 suplementado

com 10% de SFB. Após 24 h, a cultura celular foi tratada ou não com as amostras diluídas (125, 62,5, 31,2 e 15,6 µg/mL) dos compostos testados em meio DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB e acrescido de LPS (1 µg/mL, *Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, USA). A placa de cultivo celular foi mantida em estufa por mais 24 h e, após este período, o sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados foi coletado para avaliação de mediadores inflamatórios, que não pôde ser realizada neste primeiro momento.

#### *3.4.4 Avaliação da citotoxicidade celular*

Avaliou-se a citotoxicidade celular das amostras através do método colorimétrico de MTT. Este método avalia a funcionalidade mitocondrial das células. Para a avaliação da citotoxicidade celular na cultura de macrófagos tratada com as amostras, acrescentaram-se 10 µL de MTT (5 mg/mL, Sigma Aldrich) em cada poço e, após 3 h de incubação a 37 °C, na ausência de luz, visualizou-se a formação dos cristais de formazana, que possuem cor roxa. Após a incubação, o sobrenadante das células foi descartado e os cristais de formazana, solubilizados em isopropanol adicionado de ácido clorídrico (HCl) (4 mM) (MOSMANN, 1983). A leitura foi feita em espectrofotômetro de placa a 570 nm (Dinatech MR5000). Os valores obtidos na leitura foram convertidos a percentual de citotoxicidade e comparados ao controle negativo de morte celular (cultura de macrófagos estimulados por LPS) e ao controle positivo (cultura de macrófagos estimulados por LPS e acrescidos de 20 µL de Triton X-100 a 1%). Também foi avaliado o DMSO (Sigma Aldrich), solvente utilizado na ressuspensão das amostras liofilizadas, para garantir a não interferência do solvente em termos de citotoxicidade celular nos ensaios realizados.

#### *3.4.5 Capacidade inibitória em cultura de macrófagos infectados*

A avaliação da capacidade inibitória foi realizada em modelo de infecção *in vitro* de macrófagos RAW 264.7. A cultura celular de macrófagos foi plaqueada utilizando meio

de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% SFB na concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL e, após 24 h, esta foi infectada pelas cepas micobacterianas separadamente na razão MOI (multiplicidade da infecção) de 1 bacilo/1 macrófago. Após 3 h de incubação, a cultura infectada foi lavada por duas vezes com PBS 1X estéril (200  $\mu$ L/poço) para retirada de bactérias extracelulares que não foram fagocitadas pelos macrófagos. Logo após, as amostras foram diluídas na concentração de 125  $\mu$ g/mL em meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB e dispostas sobre a cultura de macrófagos infectada, por 4 dias, a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Para a análise do crescimento micobacteriano intracelular utilizou-se o método de CFU (Unidade Formadora de Colônia). A cultura celular infectada foi lisada com Triton 0,1% (Sigma Aldrich) e o sobrenadante foi diluído através de diluições seriadas em PBS 1X estéril, sendo semeado em duplicata em placas de petri contendo meio Ágar Middlebrook 7H10 suplementado com OADC (oleato, albumina, dextrose e catalase). Após 21 dias de incubação das placas de ágar semeadas a 37 °C, realizou-se a contagem do número de colônias e determinou-se o número de CFU/mL.

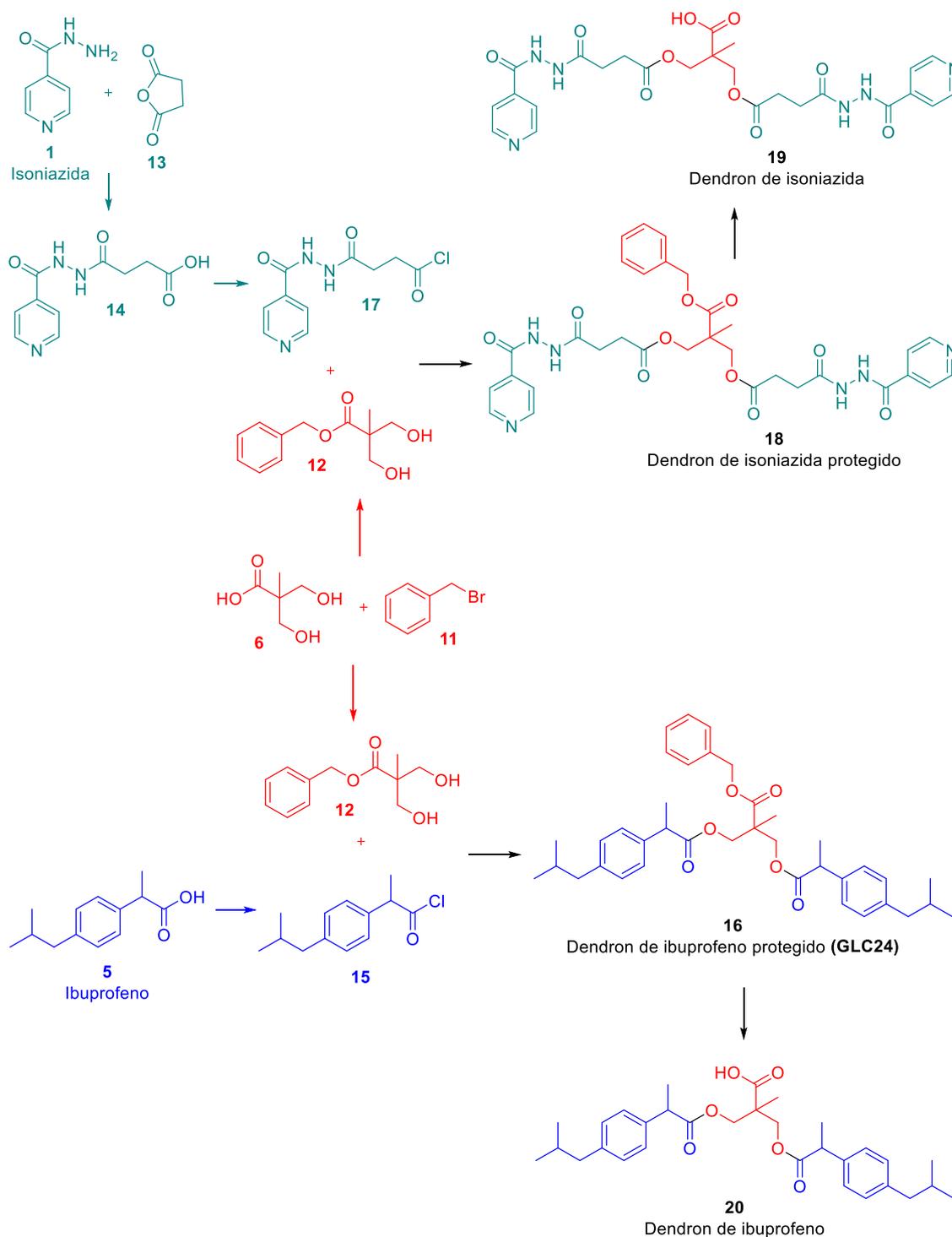
#### *3.4.6 Análises estatísticas*

Os dados foram descritos como média  $\pm$  desvio padrão e avaliados utilizando análise de variância One-Way ANOVA e por Teste de Tukey, sendo considerado significativo  $p < 0,05$ . Para calcular o IC<sub>50</sub> e o MIC<sub>50</sub> das amostras testadas utilizaram-se os resultados das curvas de concentração-resposta para cada atividade por regressão não-linear e as estatísticas calculadas para estes valores também foram avaliadas por análise de variância One-Way ANOVA e Teste de Tukey, considerando significativo  $p < 0,05$ . O Software utilizado foi o GraphPad Prism 6.

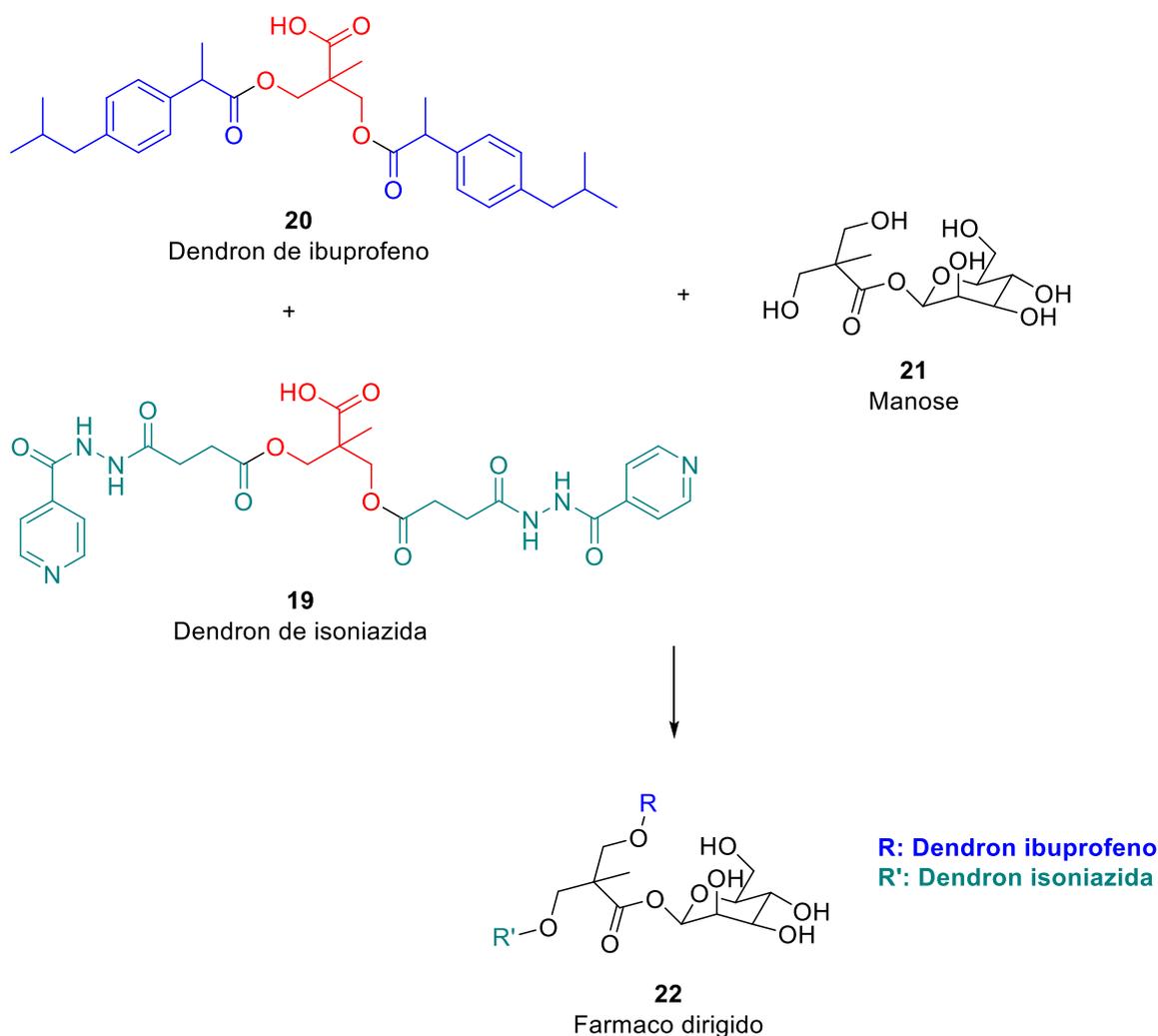
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Planejamento sintético

Conforme discutido anteriormente, o objetivo deste trabalho foi a síntese de um fármaco dendrímero dirigido potencialmente ativo para tuberculose. Nos esquemas 2 e 3 descreve-se a rota sintética total da obtenção do potencial fármaco dirigido.



**Esquema 2** – Síntese do dendron de INH (19), dendron de ibuprofeno protegido (16) e dendron de IBP (20).

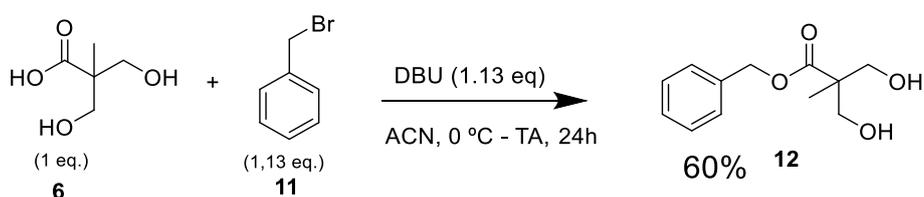


Esquema 3 – Síntese do fármaco dirigido (23).

#### 4.2 Síntese do dendron de ibuprofeno

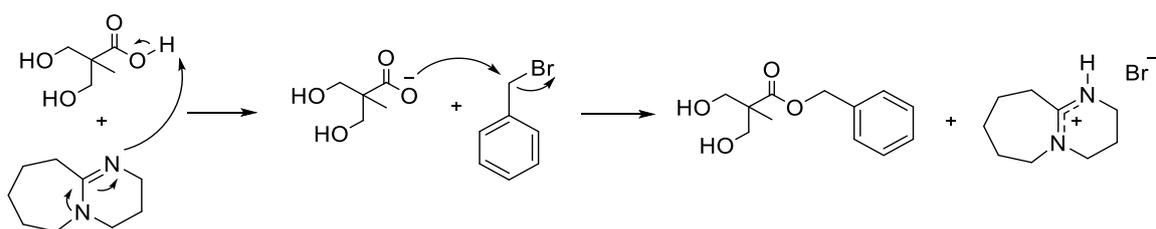
Para a síntese do dendron de ibuprofeno (21), iniciou-se a síntese pela proteção do *bis*-MPA protegido (12). Optou-se por utilizar *bis*-MPA (6) como transportador dos fármacos dirigidos, uma vez que sua estrutura química é composta por duas hidroxilas passíveis de ligação covalente com os fármacos de escolha e, também, pela presença de um grupo carboxila, que permite o crescimento da geração do dendron para posterior acoplamento à manose. Portanto, para realizar a ligação dos fármacos às hidroxilas foi

necessária a proteção do ácido carboxílico para mantê-lo íntegro e evitar reações cruzadas, que gerariam subprodutos indesejados, dificultando a purificação e diminuindo o rendimento da reação. Desta forma, o grupo carboxílico do *bis*-MPA (**6**) foi protegido com brometo de benzila (**11**), empregando DBU como base, formando o éster benzílico correspondente (**12**) com 60% de rendimento (Esquema 4) (COADY *et al.*, 2014; GONZAGA, 2017).



**Esquema 4** – Proteção *bis*-MPA (**12**).

O esquema 5 ilustra o mecanismo de reação de proteção do *bis*-MPA. Utilizou-se o DBU para a remoção do hidrogênio ácido e formação de um carboxilato. Este carboxilato, por sua vez, realiza um ataque nucleofílico no brometo de benzila, formando, assim, um éster benzílico.



**Esquema 5** – Mecanismo da reação de proteção do *bis*-MPA.

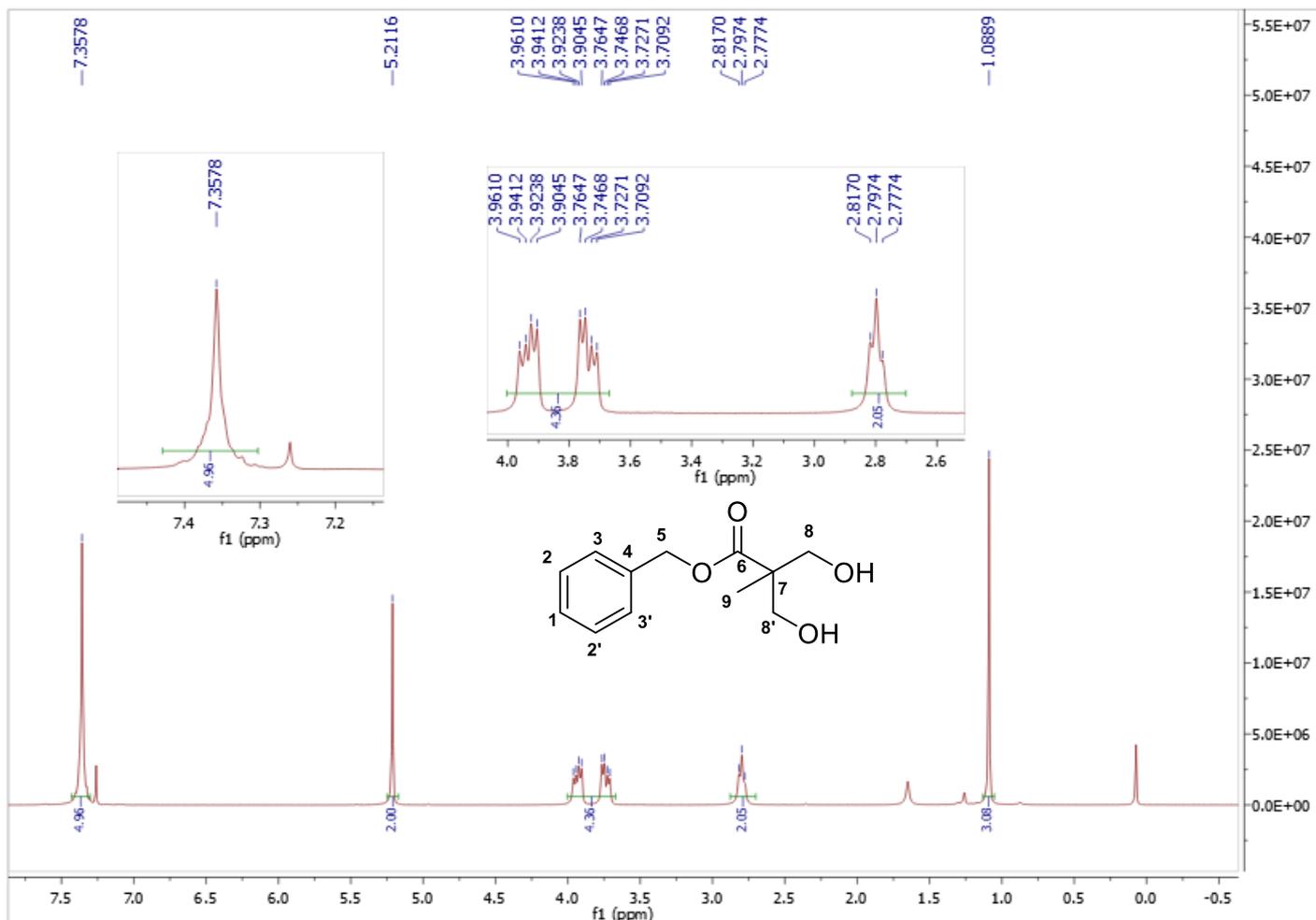
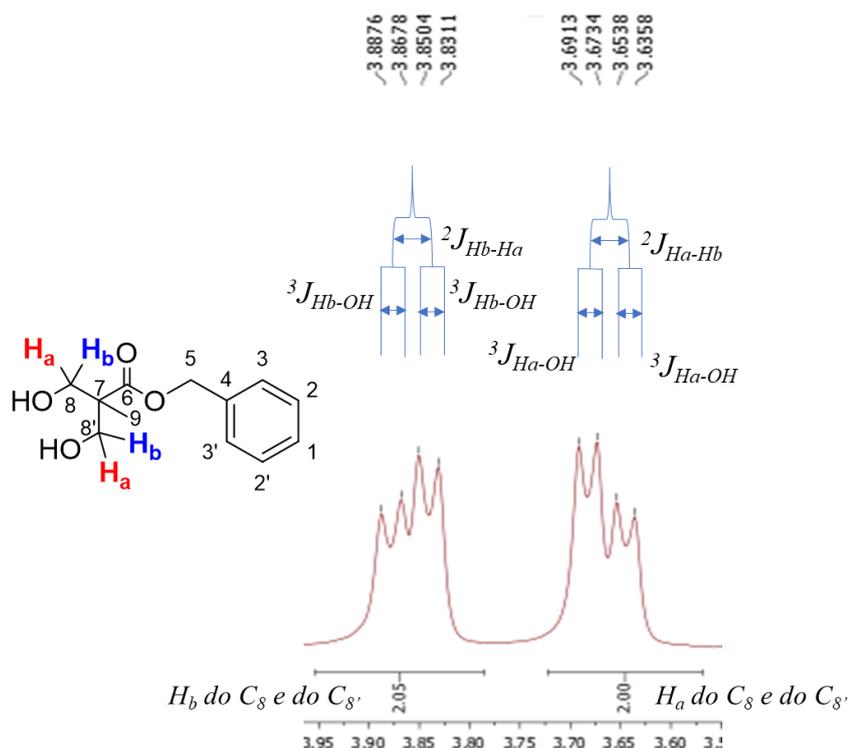


Figura 12 – RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do *bis*-MPA protegido (12).

Para confirmação da estrutura do *bis*-MPA protegido (12), analisaram-se os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os principais indicativos da formação do produto no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram: o simpleto em 5,21 ppm, representando os dois hidrogênios ligados ao  $\text{C}_5$ , e o multipletto em 7,35 ppm, referente aos 5 hidrogênios do anel benzênico (Figura 12). Visualizaram-se, ainda, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , dois sinais que integram para dois hidrogênios cada e compreendem um conjunto de 8 picos entre 3,70 a 3,96 ppm, referentes aos hidrogênios ligados ao carbono  $\text{C}_8$  e  $\text{C}_8'$  (Figura 13). Nestes sinais, verificaram-se valores de constante de acoplamento e multiplicidade referente a um acoplamento geminal (hidrogênios diastereotópicos). Por exemplo, no duplo dupletto em 3,70 ppm observou-se a

constante de  ${}^3J_{H_a-OH} = 5,37 \text{ Hz}$  referente ao acoplamento vicinal e um acoplamento maior geminal de  ${}^2J_{H_a-H_b} = 11,28 \text{ Hz}$ . Estes valores de acoplamento explicam a presença de duas duplas de dupletos (dd) de um grupo diastereotópico, pois os carbonos  $C_8$  e  $C_{8'}$  são ligados a um centro pró-quiral (carbono,  $C_7$ ). Assim, o hidrogênio da hidroxila (OH) acopla com  $H_a$  e com  $H_b$  em deslocamentos químicos diferentes, explicando o fato de o sinal se desdobrar em dois conjuntos de picos. Vale ressaltar a simetria da molécula, desta forma, o  $H_a$  em  $C_8$  tem o mesmo deslocamento químico do  $H_a$  em  $C_{8'}$  e, portanto, a integral para cada duplo duplete é referente a 2 hidrogênios ( $H_a$  do  $C_8$  e do  $C_{8'}$ ;  $H_b$  do  $C_8$  e do  $C_{8'}$ ). A título de exemplificação, atribui-se o deslocamento em 3,70 ppm como referente aos 2 hidrogênios  $H_a$  e o deslocamento em 3,96 ppm aos 2 hidrogênios  $H_b$ , entretanto, o inverso pode ser verdadeiro já que essa atribuição tão detalhada não é possível por esta análise. Ainda corroborando com a discussão anterior, visualizou-se um tripleto em 2,77 ppm referente aos hidrogênios das hidroxilas, com constante de acoplamento de 5,94 Hz relativa ao acoplamento do hidrogênio da hidroxila com os  $H_a$  e  $H_b$ .



**Figura 13** - Expansão dos sinais em 3,66 e 3,86 ppm e diagrama de árvore em  $CDCl_3$ .

O ponto de fusão do material de partida foi registrado em 90 °C – 92,1 °C, já o produto obtido obteve ponto de fusão em 72,3 °C – 74,1 °C devido à perda de uma ligação intermolecular de hidrogênio ao substituir o grupo -COOH por -COOAr. A análise no IV permitiu identificar no composto obtido grupos funcionais característicos da reação. No IV comparativo (Figura 14) pode-se observar a banda em 1720 cm<sup>-1</sup>, característica de carbonila de éster ligada a anéis aromáticos, referente ao *bis*-MPA protegido, enquanto se observa uma banda mais recuada em 1710 cm<sup>-1</sup>, devido à presença da carbonila de ácido carboxílico do *bis*-MPA. Além da presença de estiramento em 3350 cm<sup>-1</sup> referente às hidroxilas livres, observou-se banda de deformação em 746 e 710 cm<sup>-1</sup>, característica de aromático monossustituído.

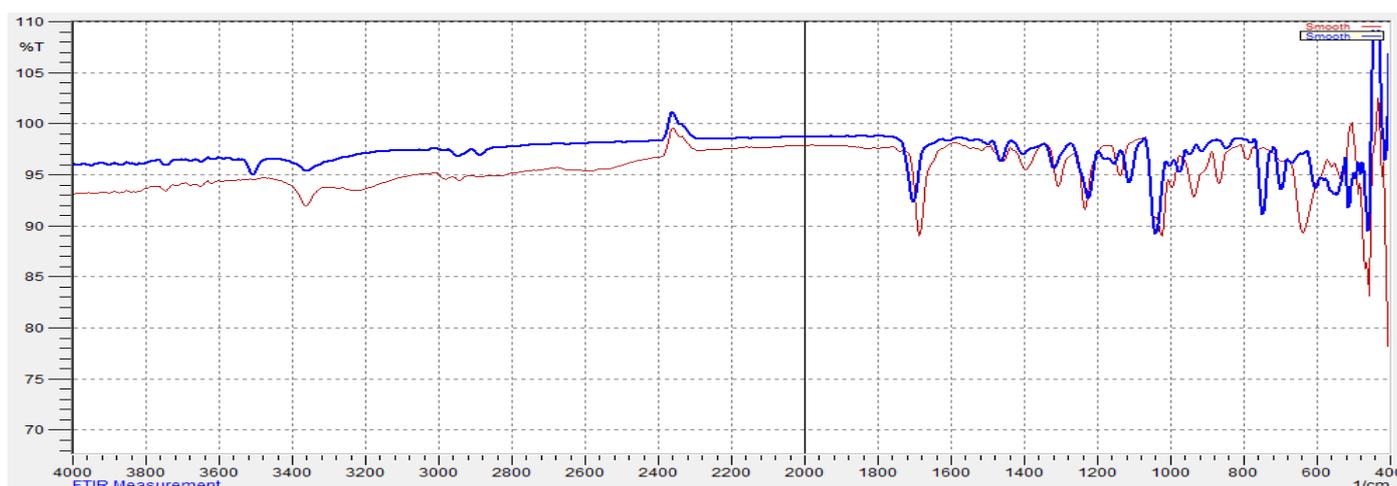
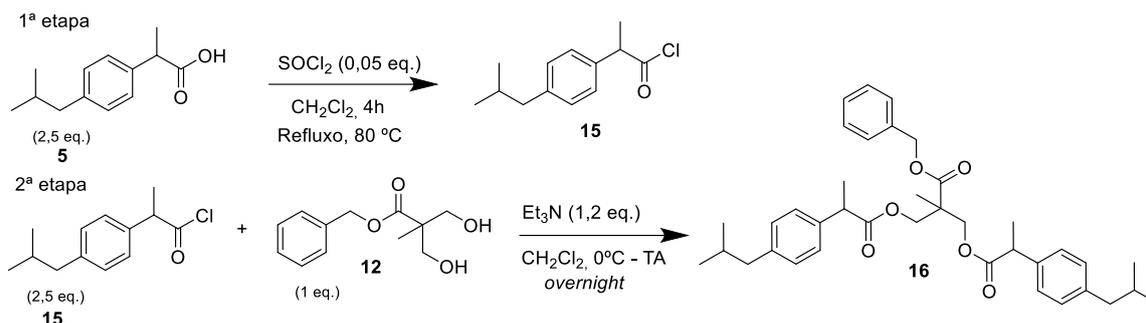


Figura 14 – IV do *bis*-MPA protegido (azul) em comparação com *bis*-MPA (vermelho).

Após a obtenção do *bis*-MPA (**12**) protegido iniciou-se a síntese do dendron de ibuprofeno (Esquema 6). Primeiramente, utilizou-se o cloreto de tionila (SOCl<sub>2</sub>) como agente para conversão do ibuprofeno em seu respectivo cloreto ácido (**15**) (1ª etapa, Esquema 6). Sem prévia purificação, o composto (**15**) foi empregado na etapa 2 juntamente com o *bis*-MPA protegido (**12**) na presença de trietilamina. Todavia, o produto desejado não foi obtido com essa metodologia.



**Esquema 6** – Síntese do dendron de ibuprofeno protegido ( $\text{SOCl}_2$ ).

A purificação do produto foi o maior desafio dessa metodologia. A remoção do  $\text{SOCl}_2$  remanescente foi feita através de destilação após a primeira etapa e, também, após a segunda etapa da reação, ambas sem pressão reduzida. Dessa forma, ainda foi possível verificar a presença de  $\text{SOCl}_2$  na amostra. Mesmo assim seguiu-se para a purificação do produto em cromatógrafo automatizado e a fração obtida referente ao  $R_f$  0,73 foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . No espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 15) verificaram-se indicativos de obtenção do dendron monossustituído com impurezas. As integrais do multipeto em 6,99 ppm referente aos hidrogênios do anel aromático do ibuprofeno ( $\text{C}_5$  e  $\text{C}_6$ ) indicam a presença de apenas 4 hidrogênios e não 8 como era de se esperar em uma dissustituição. Ademais, as integrais referentes aos demais hidrogênios da molécula de ibuprofeno também não se encontram com valor duplicado como esperado. A integral (6 hidrogênios) do duplete em 0,77 ppm referente aos hidrogênios das metilas isopropílicas ( $\text{C}_1$ ) indica, também, monossustituição, assim como o septeto referente ao hidrogênio do  $\text{C}_2$  isopropila, que integra apenas 1 hidrogênio. Mais adiante na página 57, compara-se as integrais e deslocamento químico dos produtos monossustituído e dissustituído (Tabela 1). O RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 1 dos anexos) revela a presença das carbonilas referentes ao  $\text{C}13$  e  $\text{C}9$  em 172,8 ppm e em 171,1 ppm, respectivamente.

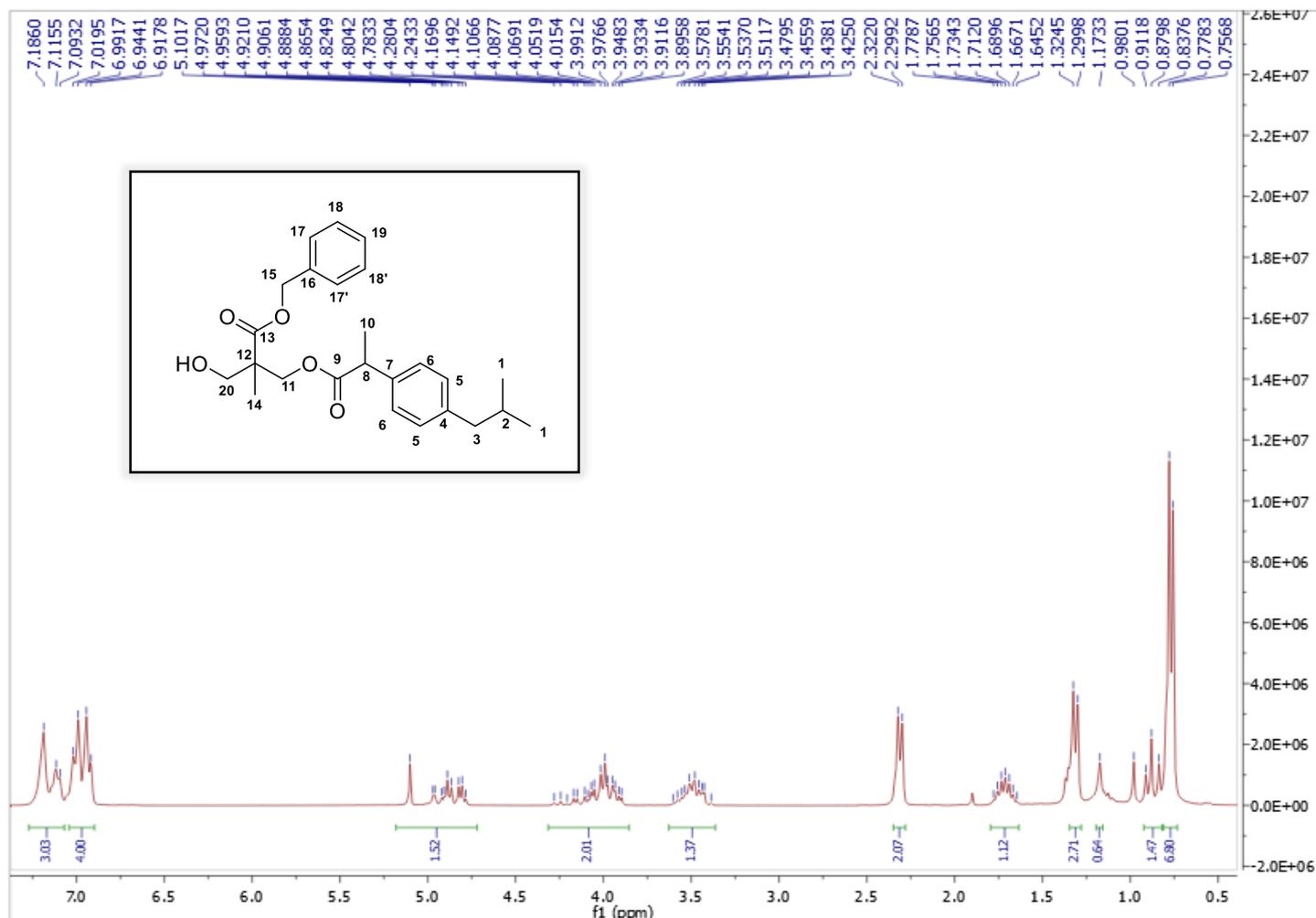
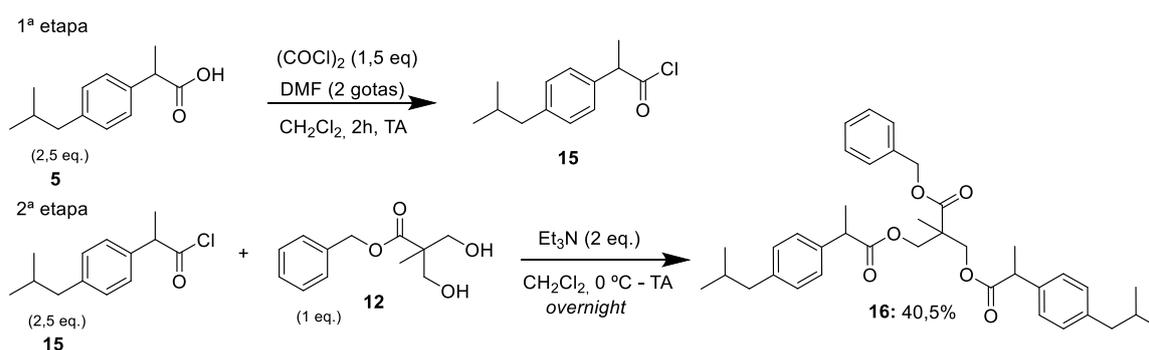


Figura 15 - RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do dendron monossustituído de ibuprofeno impuro.

Ressalta-se que esse método foi a primeira tentativa de obtenção do dendron de ibuprofeno e, após verificação da formação do produto monossustituído, optou-se por outros métodos de esterificação, uma vez que a remoção do  $\text{SOCl}_2$  se mostrou um desafio. Entretanto, é necessário destacar alguns pontos da execução dessa metodologia. Primeiramente, pode-se observar que a reação foi efetuada em quantidades insuficientes de  $\text{SOCl}_2$ , devido a um erro técnico ao adaptar a metodologia de Capim e colaboradores (2013). Utilizaram-se 0,28 mmol de  $\text{SOCl}_2$  ao invés de 28 mmol, sendo esse o principal fator pelo qual ocorreu a monossustituição. Curiosamente, ainda assim, houve dificuldade em remover o reagente remanescente por destilação, e nesta etapa, destaca-se que a destilação foi feita em TA e sem pressão reduzida. Entende-se que sob condições de

fornecimento de energia e sob pressão reduzida a destilação do  $\text{SOCl}_2$  remanescente seria devidamente realizada.

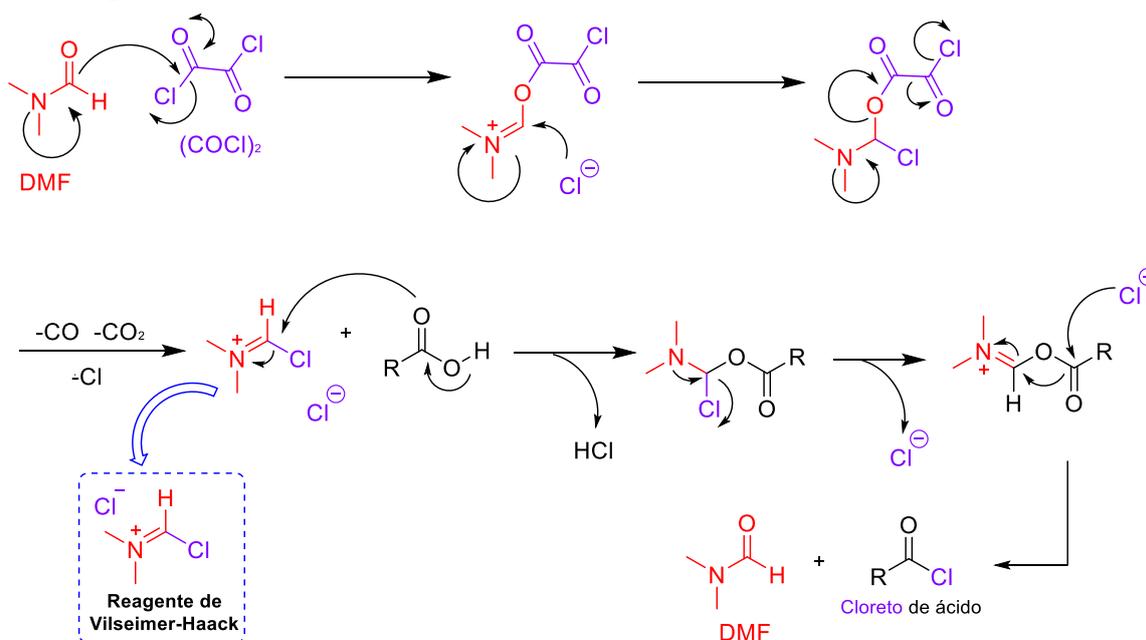
Frente ao insucesso da rota sintética anterior, buscaram-se outras metodologias para a obtenção do dendron de ibuprofeno protegido (**16**). Desta forma, empregou-se o cloreto de oxalila ao invés do  $\text{SOCl}_2$  como agente para conversão do ibuprofeno em seu respectivo cloreto ácido (**15**), alterando a metodologia da 1ª etapa (1ª etapa, Esquema 7). A substituição do cloreto de tionila pelo cloreto de oxalila fornece menos interferentes para a formação do cloreto de ácido, como por exemplo realizar a cloração a TA e em menos tempo (80 °C e 4 horas vs TA e 2 horas). Ademais, os subprodutos da reação com  $(\text{COCl})_2$  são menos nocivos ( $-\text{CO}$  e  $-\text{CO}_2$ ) em relação aos subprodutos da reação com  $\text{SOCl}_2$  ( $\text{SO}_2$  e  $\text{HCl}$ ). Junte-se a essas a vantagem de ser possível remover o excesso de  $(\text{COCl})_2$  por pressão reduzida, o que, por sua vez, facilitou o processo de purificação do produto. Após a obtenção do produto desejado (**15**), sem prévia purificação, este foi empregado na segunda etapa com o *bis*-MPA protegido (**12**) e  $\text{Et}_3\text{N}$ , para obtenção do composto (**16**) com 40,5% de rendimento.



**Esquema 7** – Síntese do dendron de ibuprofeno protegido (**16**)  $(\text{COCl})_2$ .

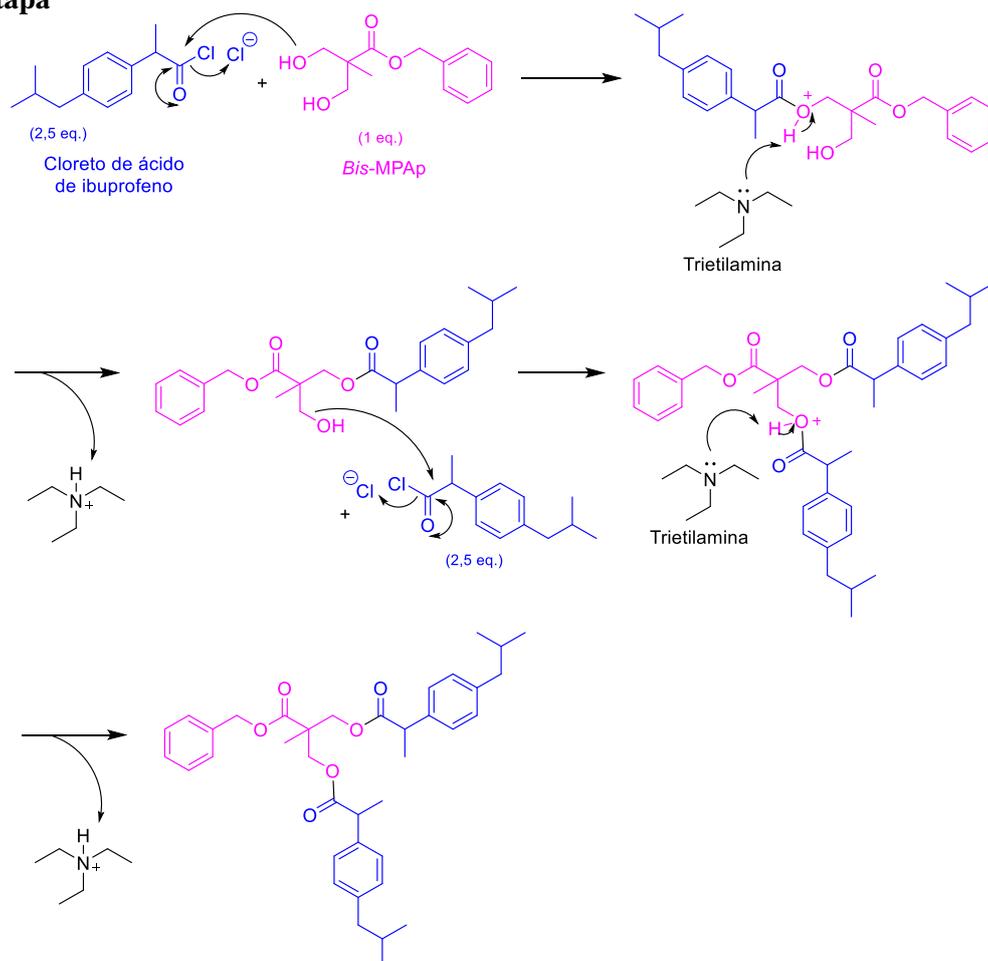
A reação de formação do cloreto de ácido de ibuprofeno se inicia com a reação entre DMF e o cloreto de oxalila., por meio de um ataque nucleofílico do oxigênio do DMF em uma das carbonilas do cloreto de oxalila, liberando o cloreto como grupo abandonador. O intermediário imino sofre um ataque nucleofílico do cloreto do meio e o rearranjo intramolecular leva à formação do reagente de Vilsmeier-Haack, que sofre um ataque promovido pelo respectivo ácido carboxílico a ser convertido, nesse caso o ibuprofeno, dando origem ao cloreto de ibuprofenila. Utiliza-se o DMF como catalizador, que se regenera após reação entre o reagente de Vilsmeier e o ácido carboxílico. A segunda etapa consiste na conversão do cloreto de acila em éster. Na presença de uma base, este ácido irá sofrer um ataque nucleofílico pelas hidroxilas do *bis*-MPAp (**12**), dando origem à formação do respectivo éster. Como a molécula de *bis*-MPAp (**12**) possui duas hidroxilas, espera-se que ambas reajam para dar origem ao produto dissustituído e, para isso, foi necessário adequar as condições de reação. Os esquemas 8 e 9 mostram o mecanismo de reação descrito.

### 1ª Etapa



**Esquema 8** – Mecanismo de reação da formação do cloreto de ácido.

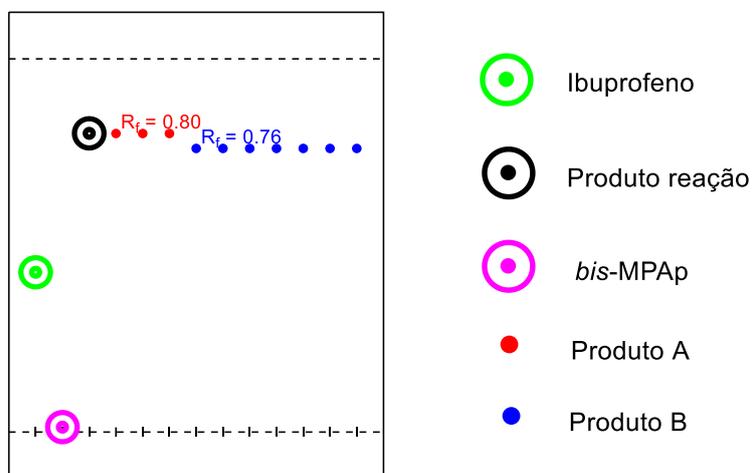
## 2ª Etapa



**Esquema 9** – Mecanismo de reação de formação do dendron de ibuprofeno (**16**).

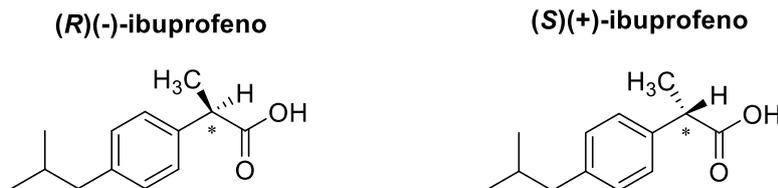
Este método, além de mais simples, também oferece uma reação mais *clean*, que era o objetivo, uma vez que a purificação pelo método anterior se mostrou um desafio. O método com cloreto de oxalila facilitou a extração do produto do meio reacional. A purificação do produto foi feita por cromatógrafo automatizado, que foi programado para extrair o material referente ao  $R_f$  0,8. No entanto, após a purificação, observou-se que as frações coletadas possuíam  $R_f$  diferentes, apesar de bem próximos  $R_f$  0,8-0,76, indicando que o cromatógrafo separou dois produtos diferentes referentes à mancha inicial de  $R_f$  0,8. O produto majoritário (0,49 g; 40,5% rendimento) foi coletado nas primeiras frações, portanto de  $R_f$  0,8 (Produto A). A coleta das frações seguintes foi referente ao produto

minoritário, de  $R_f$  0,76. A coleta dessas frações deu origem a cerca de 5 mg de produto (Produto B). A Figura 16 ilustra a CCD obtida após purificação por coluna automatizada.



**Figura 16** - Representação da CCD referente à purificação automatizada da reação do dendron de ibuprofeno protegido (Produto A = **16**).

Para ambos os produtos realizou-se análise de RMN de  $^1\text{H}$ . Por falta de amostra, apenas no produto A (**16**) a análise foi mais completa com RMN de  $^{13}\text{C}$ , APT e RMN 2D (COSY e HETCORR). Para caracterização do produto A (**16**) foi necessário entender como a molécula se comporta no espaço tridimensional, uma vez que as diferentes condições espaciais interferem no entendimento dos resultados obtidos. O ibuprofeno (**5**) utilizado nas reações é uma mistura racêmica entre os enantiômeros R(-)-ibuprofeno e S(+)-ibuprofeno. Enantiômeros, por sua vez, são moléculas que possuem as mesmas características físico-químicas, exceto pelo desvio do plano da luz polarizada, no qual um enantiômero em solução rotaciona o plano da luz polarizada para direita (+, dextrogiro). A outra solução de enantiômero é responsável por rotacionar o plano da luz polarizada para esquerda (- ou levogiro), portanto classificam-se como isômeros ópticos. Quando existe mistura racêmica (RS)-ibuprofeno, não ocorre desvio da luz polarizada (TESTER, 2003; EVANS, 2001; LEWIS, 2013).

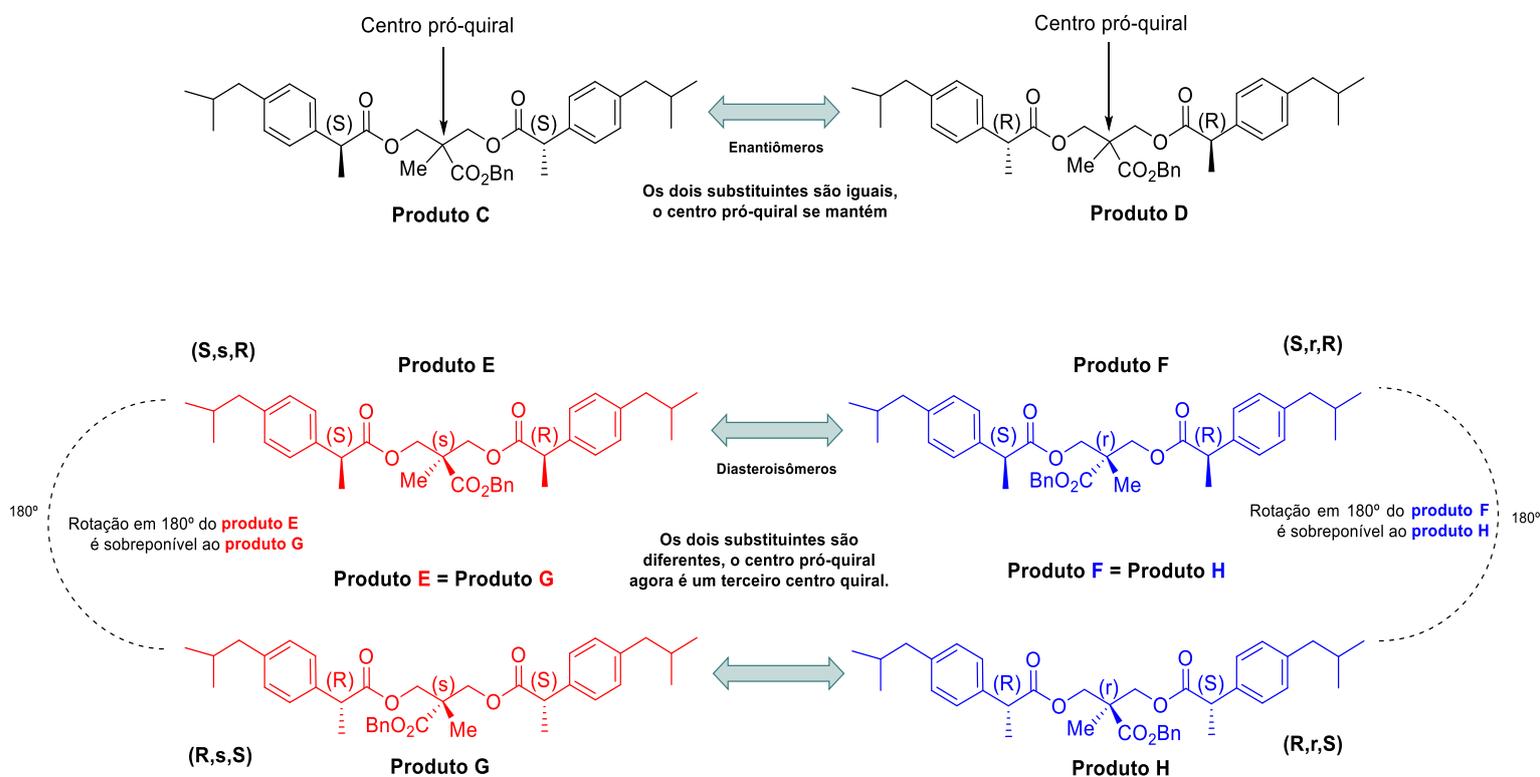


**Figura 17.** Carbono quiral do ibuprofeno da origem a dois isômeros ópticos (R) e (S).

Ao se partir de mistura racêmica na síntese de **16**, o produto consiste em mistura de enantiômeros e diastereoisômeros. Caso as substituições ocorram a partir de isômeros iguais, S,S (**produto C**) ou R,R (**produto D**), serão formados enantiômeros, uma vez que a imagem especular de C não é sobreponível à de D. Entretanto, o *bis*-MPAp (**12**) possui um carbono pró-quiral, que será quiral quando a substituição for feita a partir de dois isômeros diferentes de ibuprofeno, criando-se um terceiro estereocentro. Portanto, neste caso, tem-se a possibilidade de formação de 4 produtos: SSR (**produto E**), SRR (**produto F**), RSS (**produto G**) e RRS (**produto H**). Dessa forma, ao final da reação seriam esperados 6 tipos de isômeros. No entanto, foi verificado que os produtos E e G são a mesma molécula, assim como os produtos F e H também são na realidade a mesma molécula. Chegou-se a essa conclusão ao observar que a rotação em 180° do **produto E** origina uma estrutura que é sobreponível ao **produto G**, evidentemente, observa-se o mesmo resultado ao rotacionar o **produto G** em 180°. Os produtos F e H possuem, também, essa mesma relação. O esquema 10 mostra todos os possíveis produtos formados e, também, suas relações isoméricas.

Diastereoisomêros, diferentemente dos enantiômeros, possuem propriedades físico-químicas diferentes, e, portanto, não têm deslocamento químico equivalente. O fato de terem propriedades diferentes os diferem em ponto de fusão, atividade biológica (enantiômeros também) e deslocamento químico, por exemplo. Portanto, a purificação da reação realizada pelo cromatógrafo deve ter separado moléculas semelhantes, mas não a ponto de isolar cada isômero. Acredita-se que tanto no produto A quanto no produto B

exista mistura de isômeros. Portanto, espera-se que análise de RMN de  $^1\text{H}$  apresente deslocamentos distintos no mesmo espectro.



Esquema 10 – Possíveis isômeros de **16** formados.

No espectro de  $^1\text{H}$  (Figura 18) foi possível observar que a multiplicidade apresenta diversos picos. Salienta-se que a avaliação da multiplicidade foi prejudicada devido à mistura de isômeros, presente na amostra. Apesar de ser possível originar 4 isômeros, não se sabe se de fato irão se formar todos os isômeros propostos. Com relação aos espectros de RMN espera-se encontrar três deslocamentos químicos distintos, uma vez que o produto C e produto D são enantiômeros e possuem o mesmo deslocamento químico. Os 13 hidrogênios aromáticos (5, 5', 6, 6', 17, 18 e 19) se encontram na região dos hidrogênios aromáticos (~6,5 – 8 ppm). Na região mais desblindada (7,44 ppm) é possível identificar os hidrogênios (5 hidrogênios) referentes ao anel aromático do benzil éster e na região mais blindada (7,21 ppm) é possível identificar os hidrogênios (8 hidrogênios) referentes ao anel aromático do ibuprofeno. O sinal referente aos dois hidrogênios do carbono benzílico ( $\text{C}_{15}$ )

pode ser encontrado em 5,06 ppm. As demais integrais referentes aos sinais dos hidrogênios da molécula de ibuprofeno encontram-se devidamente duplicados, sendo esse mais um indicativo de que houve de fato a formação do produto dissubstituído, como mostra a Tabela 2. O sinal que melhor auxilia a identificação dos isômeros neste espectro é referente aos hidrogênios metílicos da posição 14, que se manifestam como 3 picos em 1,03 ppm. Os hidrogênios na posição 14 são vizinhos ao centro quiral do *bis*-MPAp (**12**) (posição 12) e podem estar sofrendo maior influência da quiralidade produzida. Quando o centro quiral não está ativo, como no caso do *bis*-MPAp (**12**), observa-se a presença de apenas um simpleto, no entanto, quando essa quiralidade é ativada, esse padrão de 3 simpletos se manifesta. Aventa-se a hipótese de que esses picos distintos podem ser referentes aos três tipos de isômeros presentes na amostra, sendo o simpleto mais intenso referente aos enantiômeros e os simpletos adjacentes referentes aos dois diastereoisômeros. A visualização, no entanto, é prejudicada pois se encontram muito próximos ao dupletto dos hidrogênios isopropílicos do ibuprofeno. O RMN de  $^1\text{H}$  do produto B (Espectro 2 dos anexos) apresenta o mesmo padrão de 3 simpletos referente aos H14, o que sugere que a purificação deu origem a dois produtos (A e B) com mistura de isômeros, além da confirmação de dissubstituição. Entretanto, não se pode afirmar qual a proporção de mistura de isômero contidos tanto no produto A quanto no produto B.

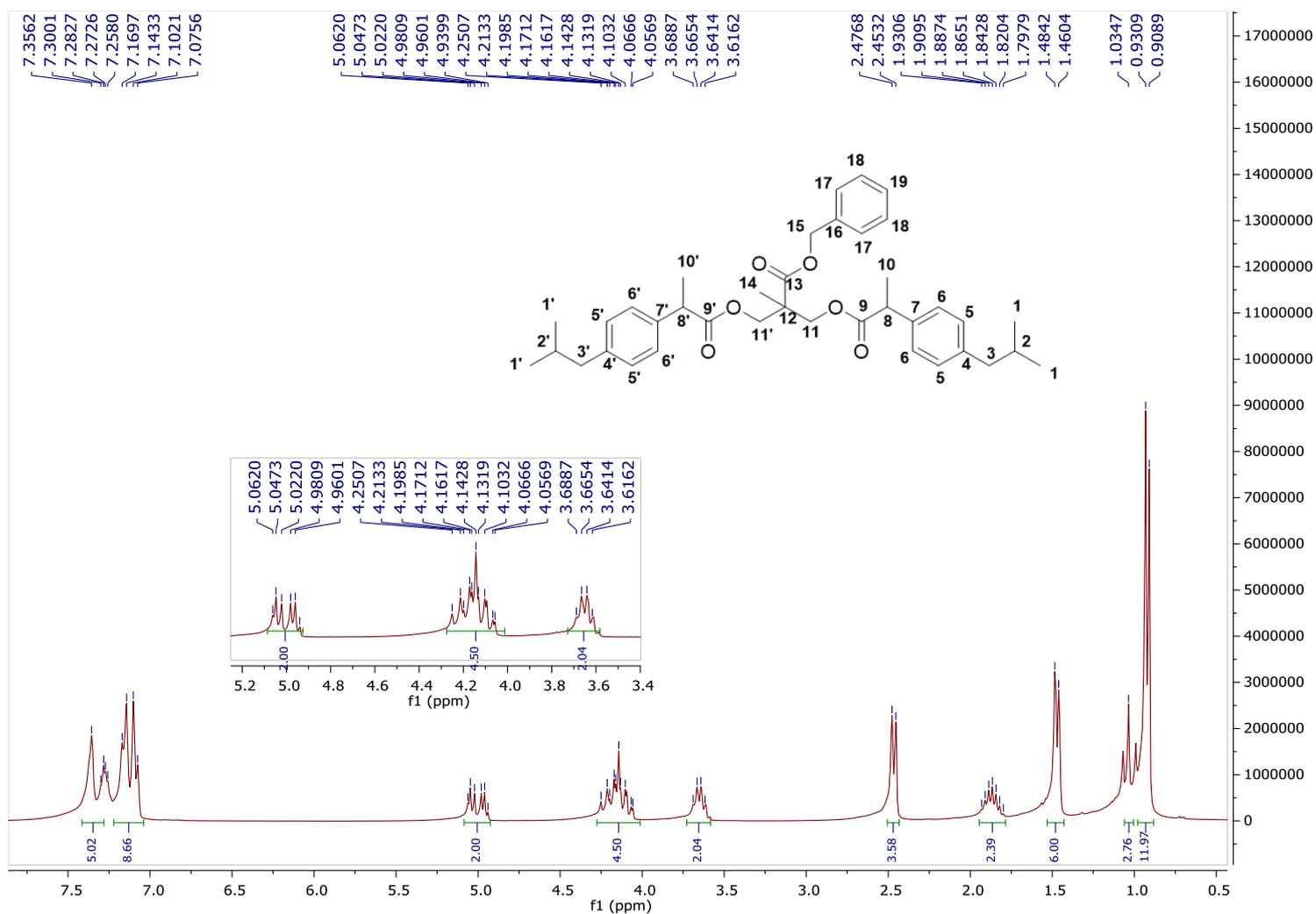
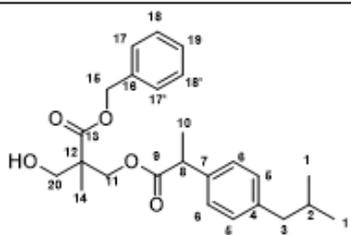
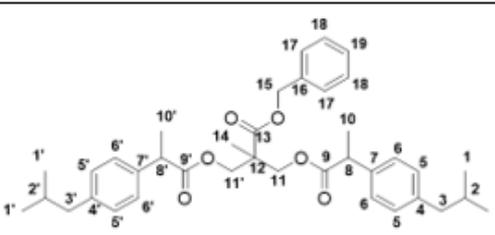


Figura 18 – RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do dendron dissustituído de ibuprofeno (16).

**Tabela 1** - RMN de  $^1\text{H}$  comparativo entre dendron monossustituído e dendron dissustituído (16).

							
Dendron monossustituído			Dendron de IBP protegido (Produto A)				
$\delta$ (ppm)	m	$\int$ (H)	$\delta$ (ppm)	m	$\int$ (H)		
1	0,75 – 0,77	d	6,8	0,90 – 1,03	d	11,97	
2	1,64 – 1,77	sept	1,12	1,79 – 1,93	sept	2,39	
3	2,29 – 2,32	d	2	2,45 – 2,47	d	3,58	
5	6,99 – 7,01	dd	4	7,14 – 7,16	dd	8,66	
6	6,91 – 6,94			7,07 – 7,10			
8	3,42 – 3,57	q	1,37	3,61 – 3,68	q	2,04	
10	1,29 – 1,32	d	2,71	1,46 – 1,48	d	6	
11	3,89 – 4,28	m	2,01	4,05 – 4,25	m	4,50	
14	0,91	s	-	1,03	s	2,76	
15	4,78 – 5,10	m	1,52	4,96 – 5,06	m	2	
17	7,09 – 7,18	m	3 (5)*	7,25 – 7,30	m	6,20 (5)*	
18				7,35			
19				7,35			

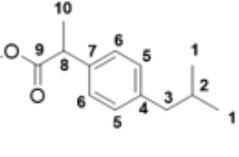
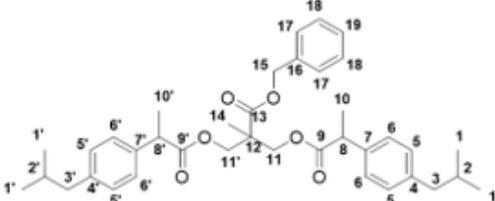
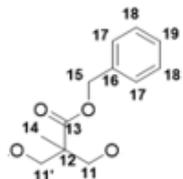
$\delta$  = deslocamento químico;

m = multiplicidade;

$\int(H)$  = integral;

\* sobreposição do sinal do  $\text{CDCl}_3$  com os H's do anel benzílico

Tabela 2 - RMN de <sup>1</sup>H comparativo entre Ibuprofeno (5), Produto A (16) e bis-MPAp (12)

									
	<b>(R,S)-Ibuprofeno</b>			<b>Dendron de IBP protegido (Produto A)</b>			<b>bis-MPAp</b>		
	<b>δ (ppm)</b>	<b>m</b>	<b>∫ (H)</b>	<b>δ (ppm)</b>	<b>m</b>	<b>∫ (H)</b>	<b>δ (ppm)</b>	<b>m</b>	<b>∫ (H)</b>
1	0,80 – 0,83	d	5,88	0,90 – 1,03	d	11,97	-	-	-
2	1,70 – 1,83	sept	1	1,79 – 1,93	sept	2,39	-	-	-
3	2,35 – 2,38	d	2	2,45 – 2,47	d	3,58	-	-	-
5	7,12 – 7,15	dd	2,02	7,14 – 7,16	dd	8,66	-	-	-
6	7,00 – 7,03		2,02	7,07 – 7,10			-	-	-
8	3,58 – 3,66	q	1,03	3,61 – 3,68	q	2,04	-	-	-
10	1,40 – 1,43	d	2,99	1,46 – 1,48	d	6	-	-	-
11	-	-	-	4,05 – 4,25	m	4,50	3,70 – 3,96	ddd	4,36
14	-	-	-	1,03	s	2,76	1,01	s	3,08
15	-	-	-	4,96 – 5,06	m	2	5,13	s	2
17	-	-	-	7,25 – 7,30	m	6,20 (5)*	7,28	m	4,96
18	-	-	-						
19	-	-	-	7,35	m				

δ = deslocamento químico;

m = multiplicidade;

∫ (H) = integral;

\* sobreposição do sinal do CDCl<sub>3</sub>

com os H's do anel benzílico

Seguindo a caracterização do produto A, verificou-se no espectro de <sup>13</sup>C (Figura 19) a presença de duas carbonilas, referente aos C<sub>9</sub> e C<sub>13</sub> em 173,4 ppm e 171,9 ppm respectivamente. Sendo esses os maiores indicativos de obtenção do produto. Podemos observar na imagem ampliada (Figura 20, A) que a carbonila em 171,9 ppm tenta “abrir” seu sinal em 3 picos, corroborando com a hipótese da existência de três isômeros na amostra como previamente discutido no RMN de <sup>1</sup>H. Podemos observar esse padrão em diversos picos no RMN de <sup>13</sup>C como nas imagens ampliadas dos carbonos aromáticos do éster benzílico (C<sub>19</sub>, C<sub>18</sub> e C<sub>17</sub>) (Figura 20, B) e carbono metílico (C<sub>10</sub>) em 17,4 ppm (Figura 20, C). Ainda há outros picos que tentam alargar o sinal indicando que querem formar mais

de um pico, entretanto a frequência emitida pelo não nos permite visualizar essa separação em picos adjacentes.

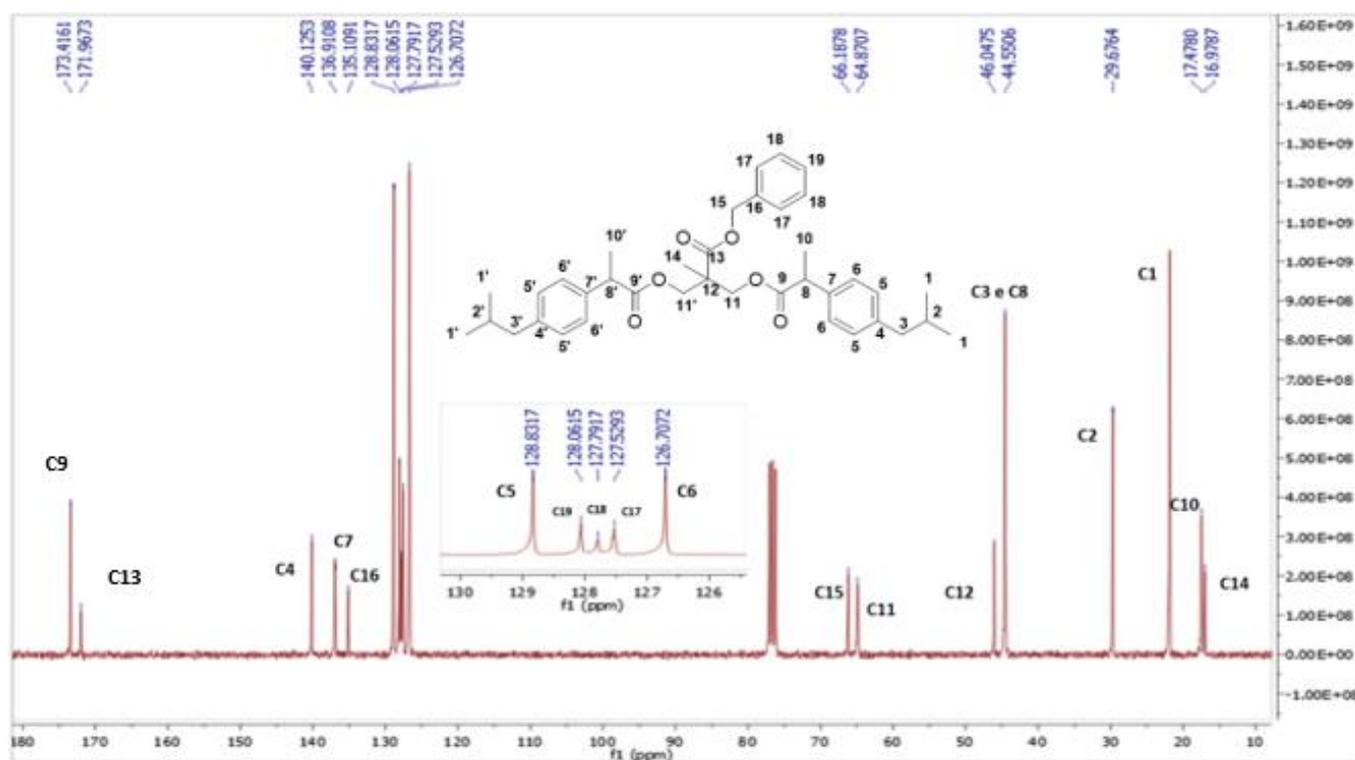


Figura 19 -  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do Produto A.

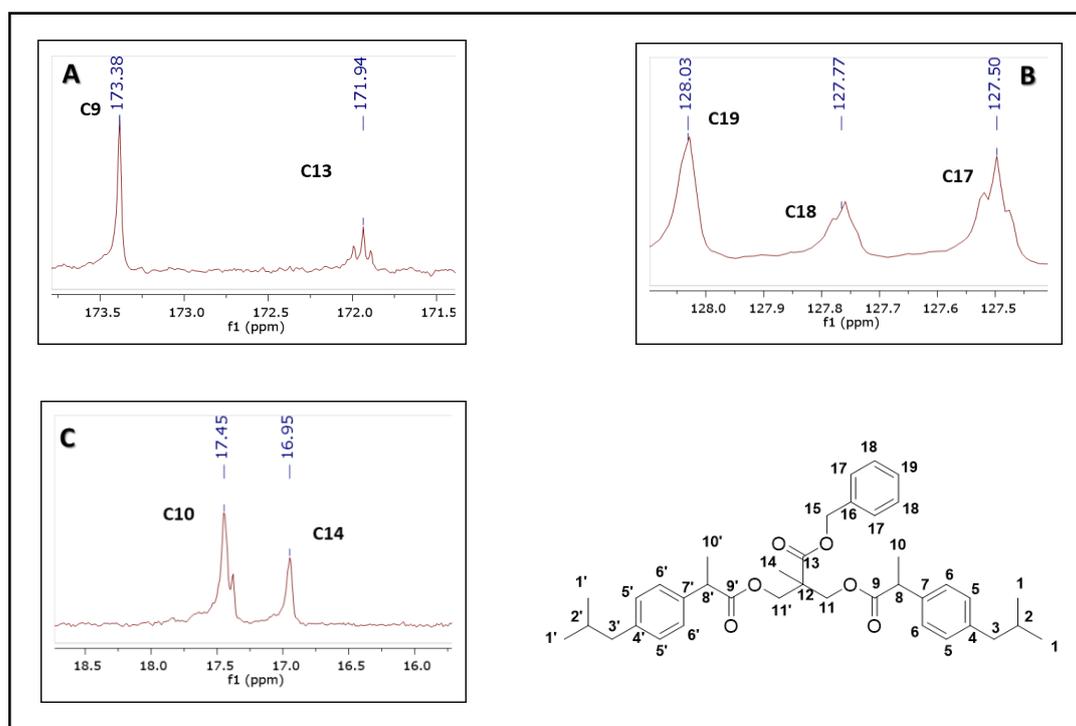
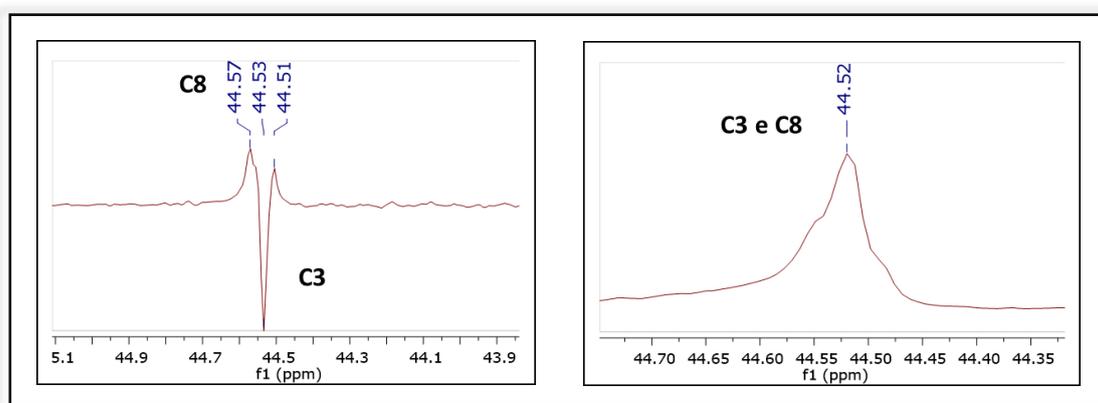


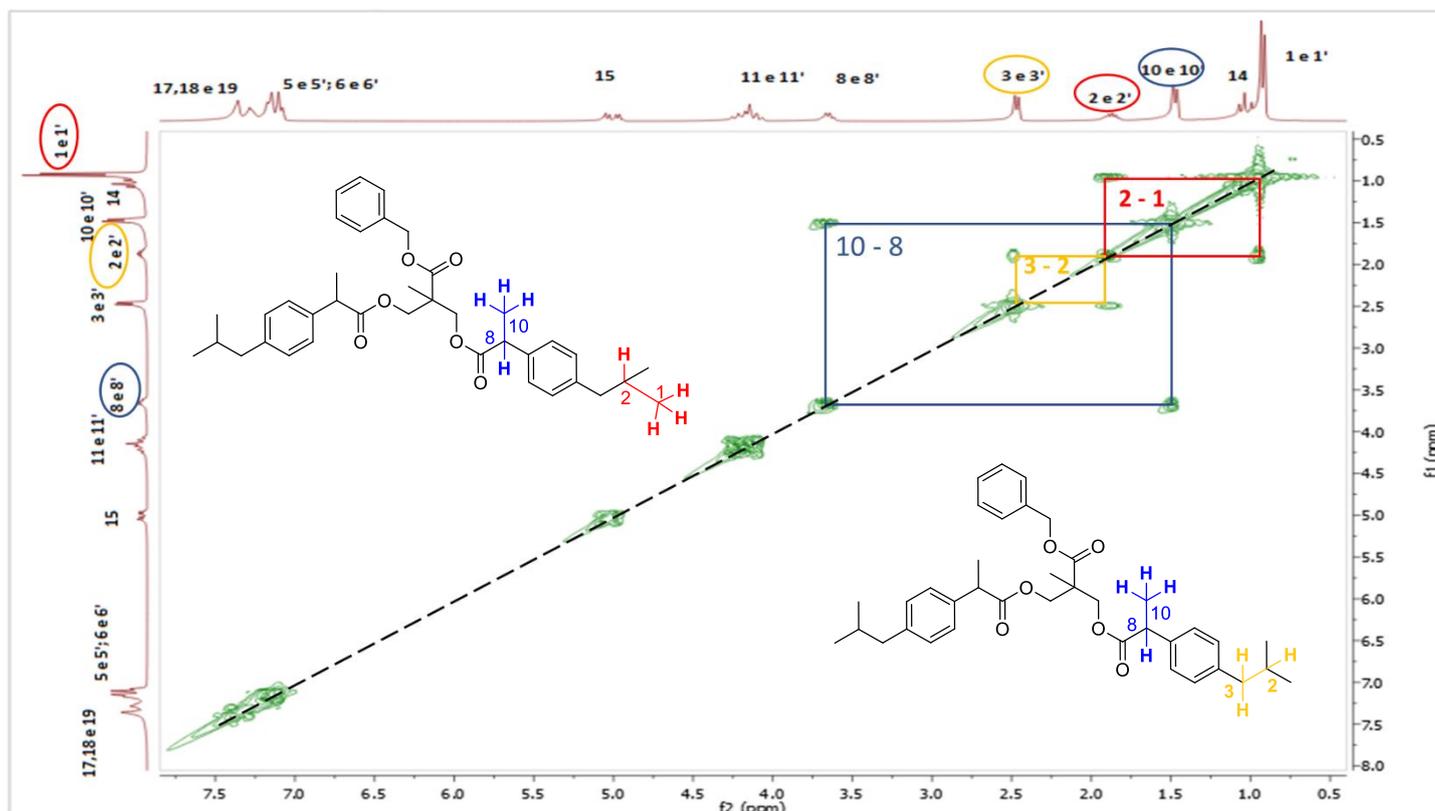
Figura 20 – Espectros de  $^{13}\text{C}$  ampliados, onde A = C13; B = C17,18 e 19; C = C10.

Através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  pode-se confirmar que o produto A foi obtido com sucesso através da metodologia utilizando cloreto de oxalila. A purificação realizada foi capaz de separar o produto desejado dos subprodutos reacionais e reagentes de partida, no entanto, não foi capaz de separar os diferentes isômeros obtidos, tão quanto elucidar quais isômeros foram formados e nem suas proporções. Ainda assim, por se tratar de uma estrutura química não trivial, realizaram-se análises complementares com o propósito de confirmar as discussões previamente feitas. A técnica de APT (*Attached proton test*), por exemplo, permite separar os sinais dos carbonos de acordo com o número de hidrogênios ligados a ele, sendo que os carbonos que possuem números ímpares de hidrogênio ( $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}$ ) são detectados invertidos no espectro e os que possuem números pares de hidrogênio ( $\text{CH}_2$ ) ou os carbonos não hidrogenados (carbonos quaternários) são detectados não invertidos no espectro. Pode-se observar que no RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 21) existe um pico mais intenso em 44,55 ppm, que está referenciado como C3 e C8. O carbono 3 é um carbono metileno ( $\text{CH}_2$ ) e o carbono 8 é um carbono metino ( $\text{CH}$ ), portanto, ao aplicar uma análise por APT pode-se confirmar a presença de todos os carbonos do produto, uma vez que o  $\text{C}_3$  foi detectado invertido no espectro diferentemente do  $\text{C}_8$  que apareceu não invertido no espectro (Figura 21).



**Figura 21** – Visualização dos C8 e C3 na técnica de APT (esquerda) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (direita).

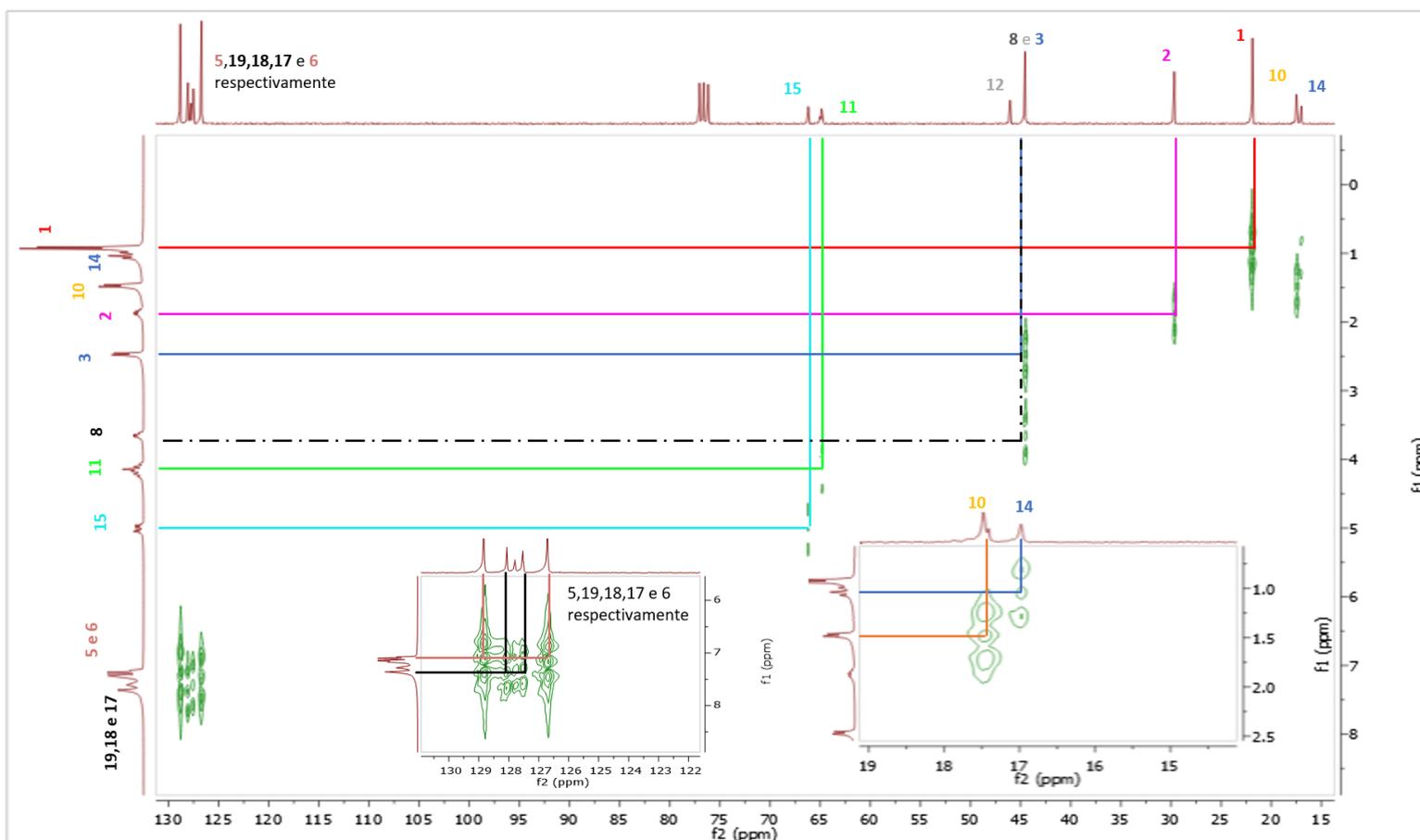
Devido à multiplicidade prejudicada apresentada no RMN de  $^1\text{H}$ , algumas constantes de acoplamento ficaram prejudicadas e, portanto, realizou-se a técnica bidimensional COSY ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) (Figura 22) para visualização e confirmação do acoplamento realizado entre o H8 – H10 ( $J_{\text{H8} - \text{H10}} = 7 \text{ Hz}$ ), H3 – H2 ( $J_{\text{H2}} = 6,75 \text{ Hz}$  e  $J_{\text{H3}} = 7 \text{ Hz}$ ) e H2 – H1 ( $J_{\text{H2}} = 6,75$  e  $J_{\text{H1}} = 6,6$ ).



**Figura 22** - Mapa de contorno de COSY do produto A ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

Por fim, realizou-se a técnica de espectroscopia heteronuclear de coerência (HETCORR) (Figura 23), técnica bidimensional que permite determinar qual carbono está ligado a qual hidrogênio ( $^1J_{\text{C,H}}$ ). Este espectro permitiu atribuir com mais precisão os carbonos e hidrogênios nos seus respectivos espectros, principalmente aqueles com deslocamento semelhante, como os carbonos aromáticos 5,5', 6 e 6' em 128,8 ppm e 126,7 ppm, respectivamente, que estão ligados aos respectivos hidrogênios na região entre 7,07 – 7,14 ppm representados pelo duplo duplete. Já os carbonos aromáticos 19,18 e 17,

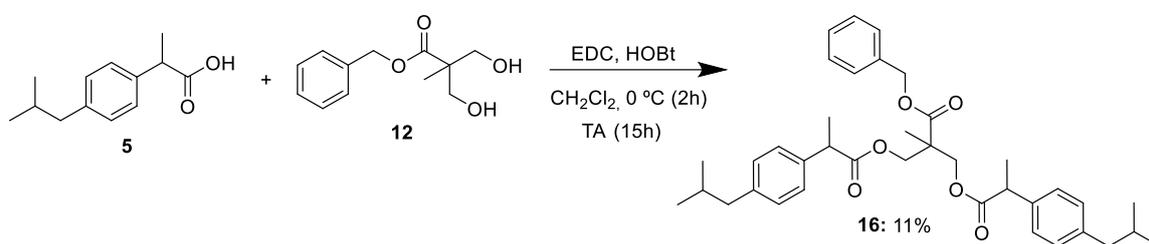
localizados em 128 ppm, 127,7 ppm e 127,5 ppm, respectivamente, estão acoplados aos respectivos hidrogênios na região mais desblindada do espectro em 7,25 – 7,35 ppm, como mostra a Figura 23. Utilizando essas técnicas complementares foi possível não só confirmar a obtenção do produto A, mas também destrinchar as relações intramoleculares do produto obtido.



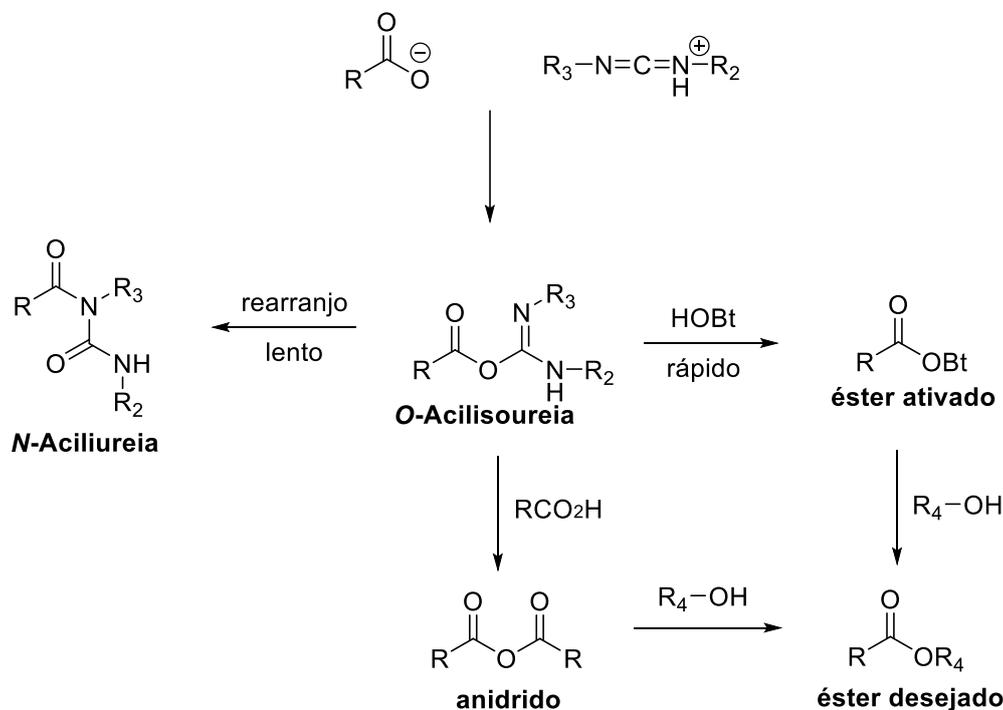
**Figura 23** - Mapa de contorno de HETCOR do produto A ( $\text{CDCl}_3$ , 300 e 75 MHz).

Independentemente do sucesso com a rota sintética anterior (empregando cloreto de oxalila), testou-se ainda, uma última opção sintética para obtenção do dendron de ibuprofeno (**16**) (Esquema 11). A síntese do dendron de ibuprofeno utilizando EDC/HOBt se mostrou menos eficiente, quando comparada ao método utilizando cloreto de oxalila (40,5% de rendimento vs 11% de rendimento). No entanto, pôde-se confirmar a obtenção

do produto A através desse método, porém com traços de impurezas, mesmo após purificação prévia em cromatógrafo automatizado (espectro 3 dos anexos). Observa-se que este método também resultou na obtenção de mistura de isômeros, evidenciado pela sobreposição dos sinais. Optou-se por utilizar HOBt como catalizador no lugar do DMAP para evitar formação do subproduto *N*-Acilisoureia como mostra o Esquema 12.



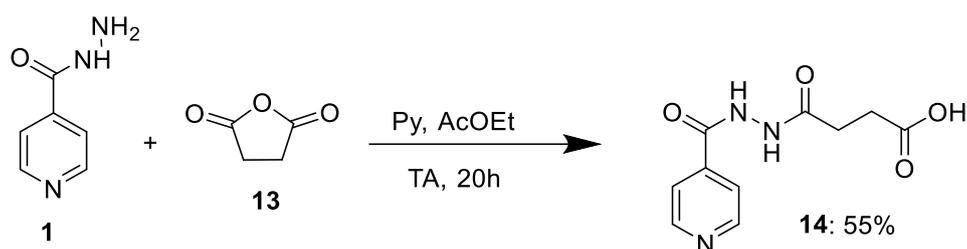
Esquema 11 – Síntese de 16 utilizando EDC/HOBt.



Esquema 12 – Mecanismo reacional geral da formação ésteres utilizando HOBt como catalizador.

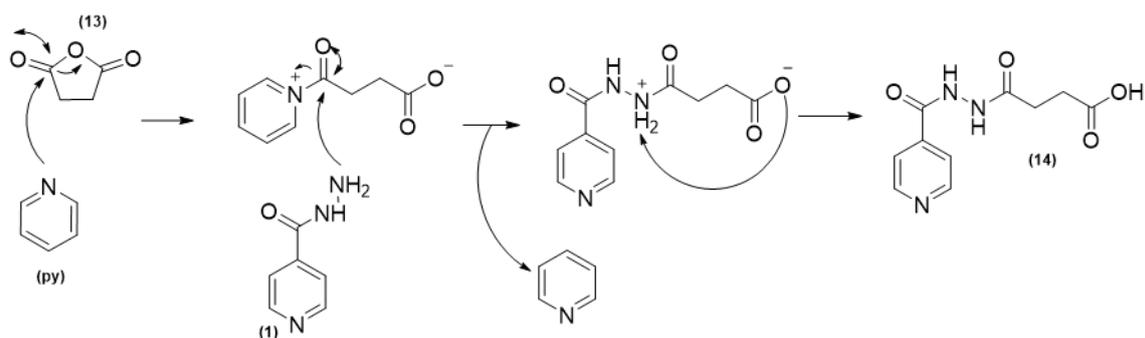
### 4.3 Síntese do dendron de isoniazida

A funcionalização da isoniazida **1**, importante para as reações subsequentes com o *bis*-MPAp, foi realizada de acordo com o protocolo de YEOH e colaboradores (2013), empregando anidrido succínico **13**, piridina como catalisador e acetato de etila como solvente, fornecendo o hemissuccinamida de isoniazida **14** com rendimento de 55% (Esquema 13) (YEOH *et al.*, 2013).



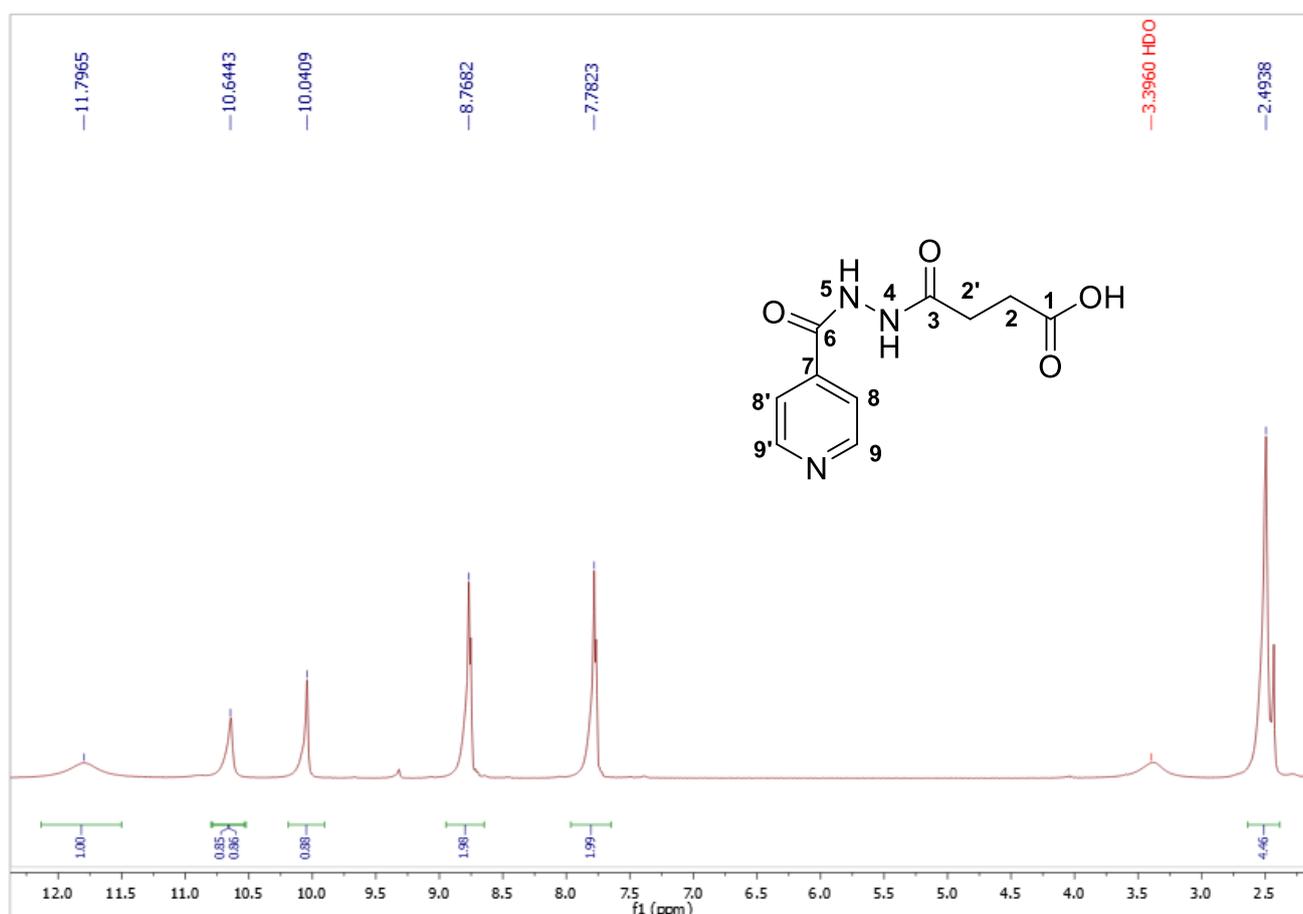
**Esquema 13** - Síntese da hemissuccinamida de isoniazida.

A reação inicia-se pelo ataque nucleofílico da piridina à carbonila do anidrido succínico, seguido pela abertura do anel e formação de um intermediário eletrofílico mais reativo, com carga positiva. A isoniazida, então, realiza um ataque nucleofílico nesta carbonila mais reativa, fornecendo o hemissuccinamida de isoniazida e regenerando a piridina.

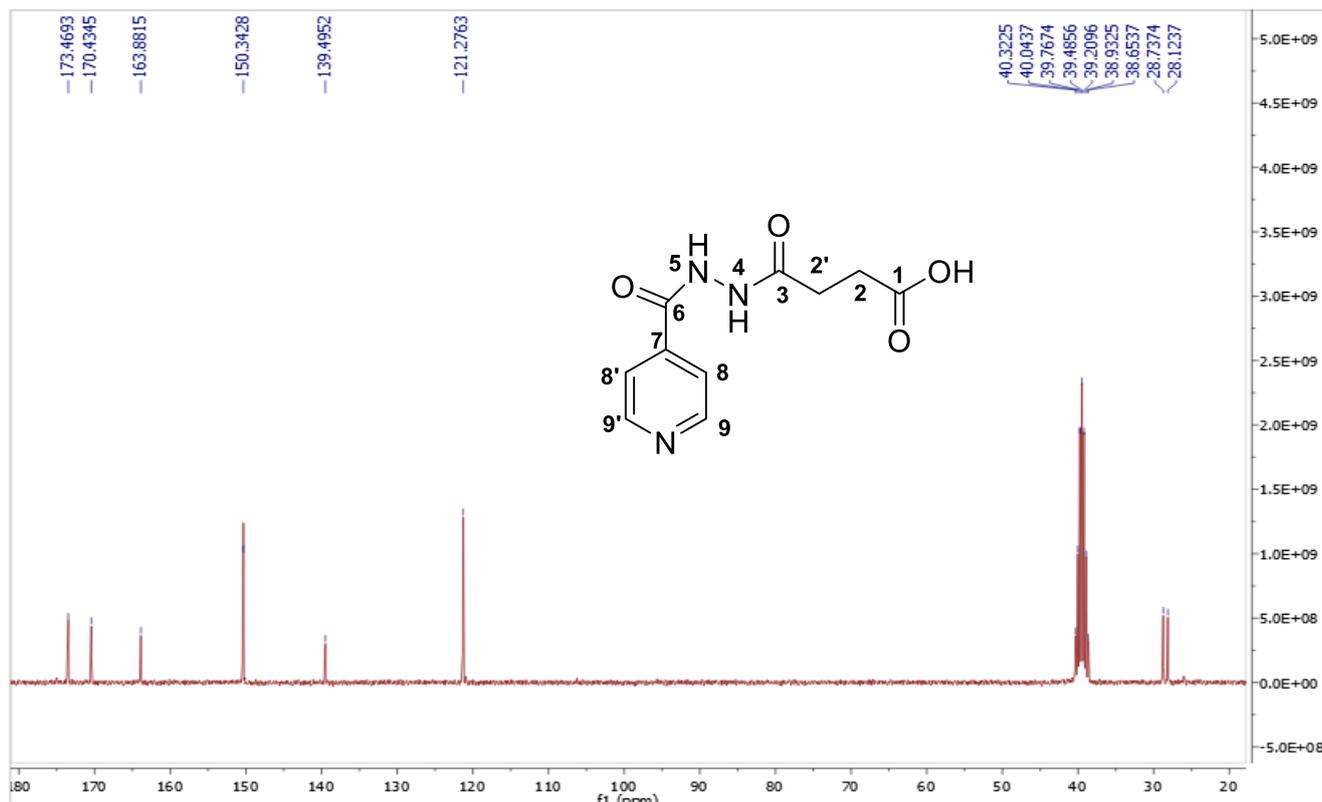


**Esquema 14** - Mecanismo de reação da formação do hemissuccinamida de isoniazida.

Ao analisar o produto obtido por RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 24) verificou-se a formação do produto desejado. Foi possível visualizar o simpleto em 11,79 ppm, referente ao hidrogênio do ácido carboxílico e os sinais referentes ao hidrogênio do nitrogênio 5 na região mais desblindada, em 10,64 ppm, e o hidrogênio mais blindado do nitrogênio 4, em 10,04 ppm. Não se pode confirmar a presença dos hidrogênios alquílicos referentes aos carbonos 2 e 2', pois aparecem na mesma região que o sinal de DMSO-d<sub>6</sub> em 2,50 ppm. Entretanto, no RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 25), pode-se confirmar a presença do carbono succínico 2, que está menos blindado em 28,76 ppm, e do carbono succínico 2' mais blindado, em 28,13 ppm. Por fim, o pico em 173,46 ppm relativo ao carbono (C1) carbonílico confirma a obtenção do hemissuccinamida de isoniazida.

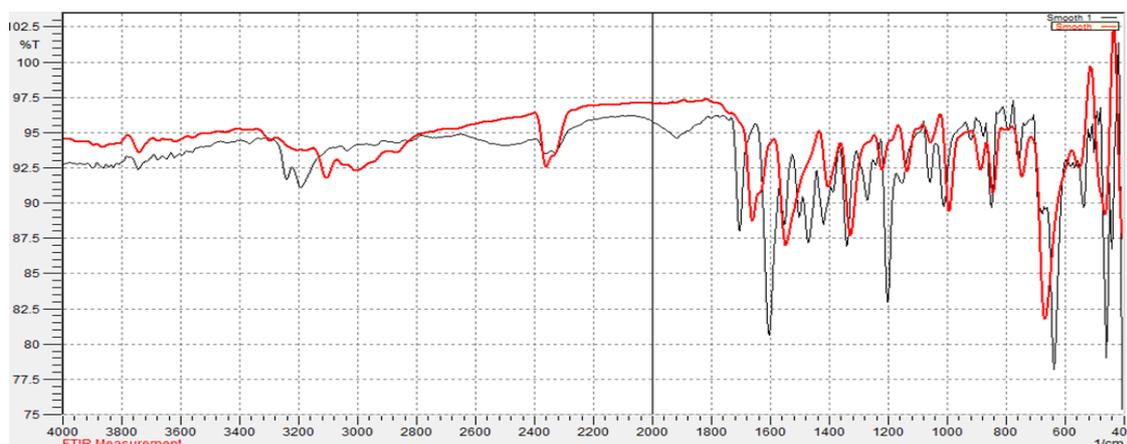


**Figura 24** - RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) do hemissuccinamida de isoniazida.



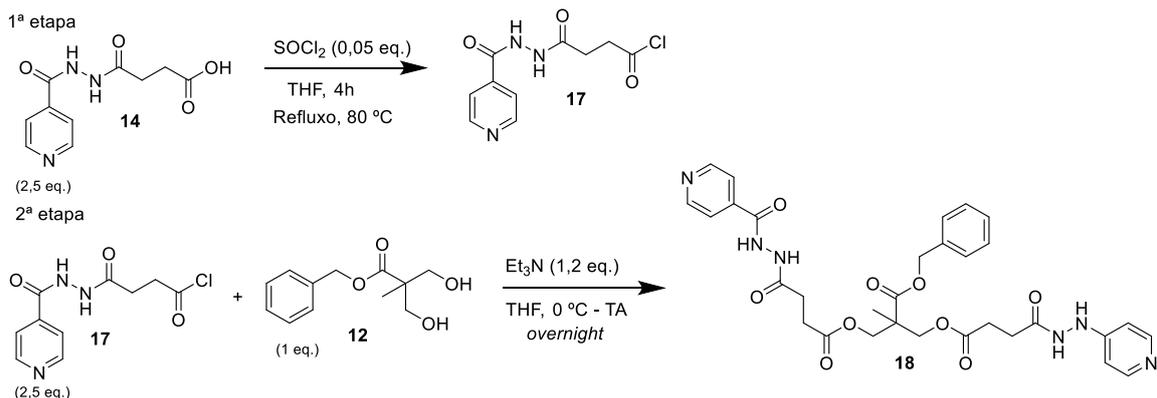
**Figura 25.** RMN de  $^{13}\text{C}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) da hemissuccinamida de isoniazida.

No espectro no IV (Figura 26), pode-se confirmar a presença do grupo carbonila devido ao estiramento axial de ácido carboxílico com banda característica em  $1705\text{ cm}^{-1}$ , assim como o estiramento relacionado às carbonilas da hidrazida, em  $1605\text{ cm}^{-1}$  e  $1580\text{ cm}^{-1}$ . Quando comparado à isoniazida, pode-se verificar a presença de apenas uma banda relacionada à única carbonila da hidrazida em  $1580\text{ cm}^{-1}$ . Por fim, o ponto de fusão obtido do produto foi de  $219\text{ }^\circ\text{C} - 221\text{ }^\circ\text{C}$  ( $221\text{ }^\circ\text{C} - 223\text{ }^\circ\text{C}$ , YEOH *et al.*, 2013), maior quando comparado à isoniazida ( $171^\circ\text{C} - 173^\circ\text{C}$ ).

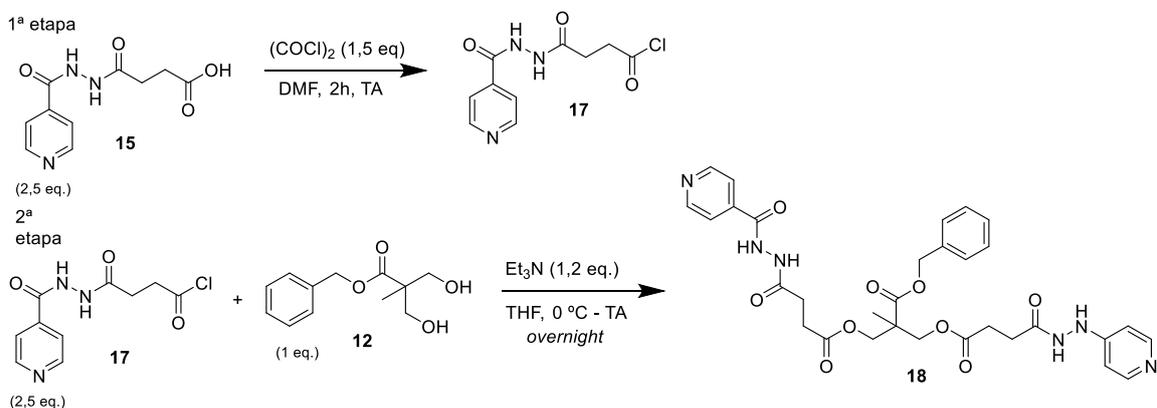


**Figura 26** - Espectro no IV da isoniazida succinoylada (preto) em comparação com a isoniazida (vermelho).

Após a obtenção do hemissuccinamida de isoniazida (**14**), iniciou-se a síntese do respectivo dendron (**18**). Inicialmente, tentou-se a síntese através da formação do cloreto de hemissuccinamida utilizando  $\text{SOCl}_2$  (Esquema 15) e  $(\text{COCl})_2$  (Esquema 16), assim como no dendron de ibuprofeno. Entretanto, não foi possível adaptar essas metodologias para o dendron de isoniazida. Durante a tentativa com  $\text{SOCl}_2$  constatou-se degradação do produto e, portanto, excluiu-se essa metodologia para obtenção do dendron de isoniazida. Já a metodologia empregando  $(\text{COCl})_2$  necessita de mais estudo para que seja possível adaptar as condições reacionais. Conforme já relatado, a reação ocorreu utilizando DMF como solvente orgânico, pois foi o único solvente minimamente capaz de solubilizar a hemissuccinamida de isoniazida. Entretanto, o DMF é utilizado como catalizador desse método e não se sabe se a quantidade em excesso de DMF pode prejudicar o resultado final dessa reação. Relata-se, ainda, que a solubilização não é 100% eficaz, o que, por sua vez, prejudicou o acompanhamento da formação dos produtos. Mesmo assim, deu-se prosseguimento à reação, utilizando como referência a metodologia da síntese do dendron de ibuprofeno, relatada anteriormente. Por fim, ao término da reação não foi possível extrair o produto do meio reacional, novamente, devido à polaridade da molécula. Portanto, não foi possível confirmar se houve a formação do dendron de isoniazida através desse método, porém relata-se que não houve indícios de degradação da molécula de partida. Essa metodologia não foi excluída dos planos futuros, pois entende-se que são necessários ajustes nas condições reacionais de acordo com os materiais que temos à disposição, para que se obtenha sucesso na síntese do dendron de isoniazida.

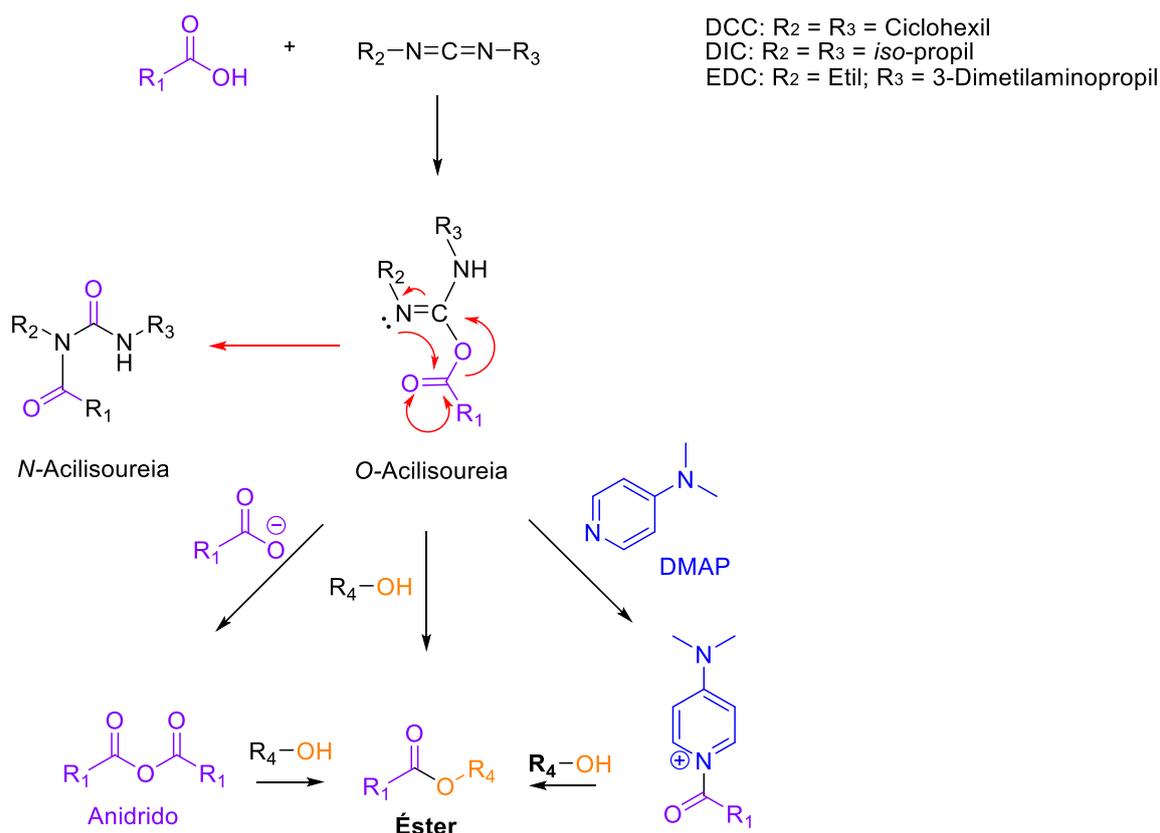


**Esquema 15** – Síntese de **18** utilizando  $\text{SOCl}_2$ .



**Esquema 16** – Síntese de **18** utilizando  $(\text{COCl})_2$ .

Frente ao insucesso dessa reação, buscou-se outra metodologia para síntese do dendron de isoniazida. Um dos métodos mais empregados na síntese de ésteres é através da utilização de carbodiimidas e DMAP. Desenvolvido por Neises e Steglich, em 1978, as condições de Steglich empregam o uso de ácidos carboxílicos e álcoois para formação do éster desejado. Utilizam-se a carbodiimida (DCC, EDC, CDI) e o DMAP para reagir com o ácido carboxílico, gerando um derivado de ácido carboxílico ativado, que, por sua vez realiza uma reação de substituição acílica nucleofílica com o álcool como nucleófilo para originar o éster desejado (Esquema 17) (LUTJEN *et al.*, 2018; TSAKOS *et al.*, 2015).



**Esquema 17** – Mecanismo geral da formação de ésteres de Steglich (Adaptado de TSAKOS *et al.*, 2015).

Para ligação da hemissuccinamida às hidroxilas do *bis*-MPAp (**12**) através da esterificação de Steglich utilizaram-se dois agentes condensantes DCC (dicicloexilcarbodiimida) e EDC (1-etil-3,3-(dimetiaminopropil)carbodiimida), ambos na presença de DMAP (4-dimetilaminopiridina) como catalisador. Inicialmente, utilizou-se DCC como agente condensante devido à sua maior reatividade, quando comparado ao EDC. No entanto, as reações com DCC levaram à formação do subproduto DCU (dicicloexilureia), que se manteve presente na amostra mesmo após sucessivas lavagens com hexano gelado, como observado no RMN de <sup>1</sup>H (Espectro 4 dos anexos). Ademais, o espectro de <sup>1</sup>H revelou que não houve formação do produto esperado, pelo contrário, nessas condições aplicadas formou-se o subproduto indesejado *N*-acilisoureia. Observou-se no espectro os hidrogênios do ciclo hexano entre 0,9 - 2,0 ppm, além dos sinais dos hidrogênios aromáticos do hemissuccinamida de isoniazida em 8,08 – 8,11 ppm e 6,81 – 6,78 ppm, que possuem *J* = 6,9 e 7,2 respectivamente, indicando que são de fato os

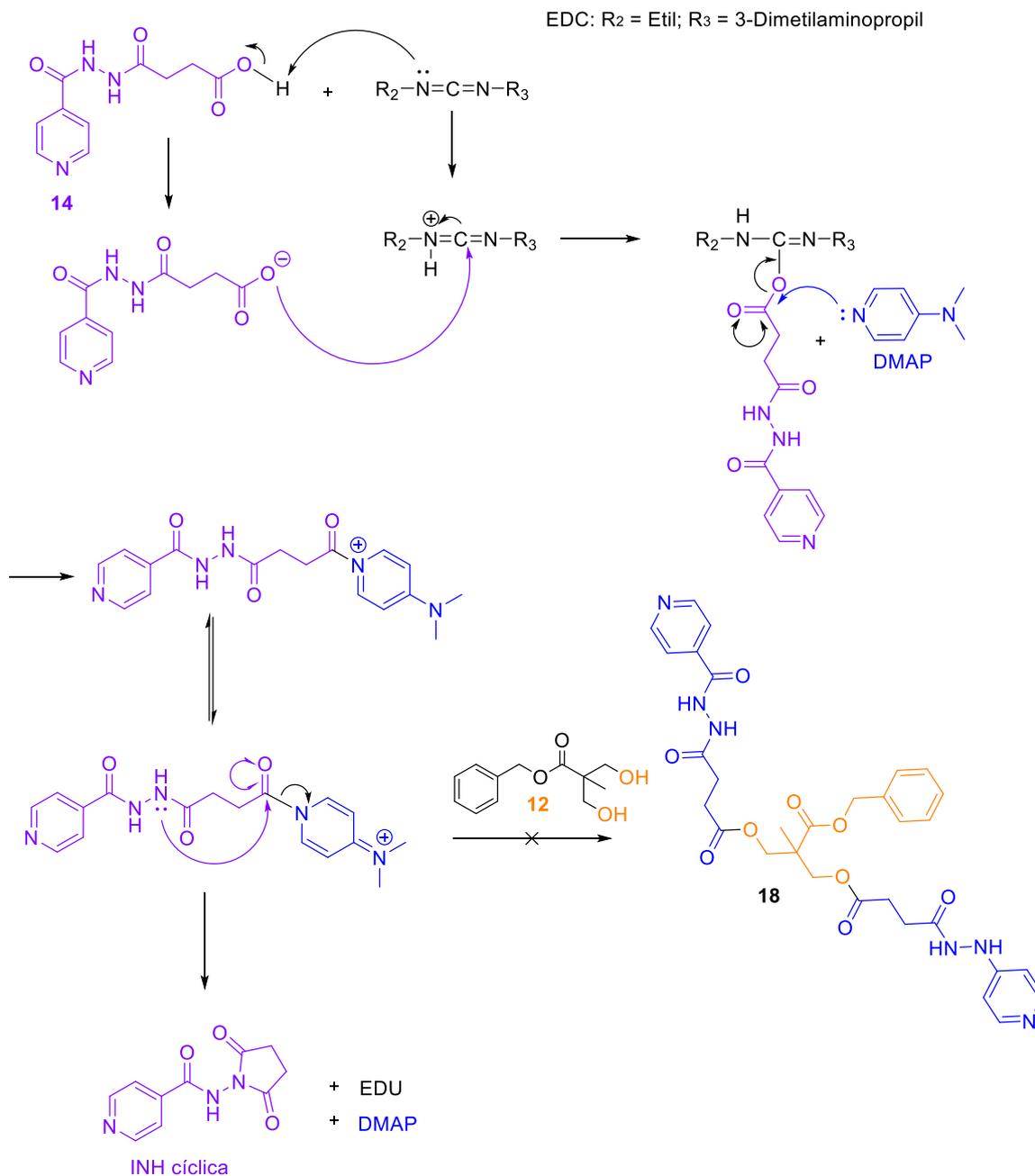
hidrogênios do anel aromático da isoniazida. A formação desse subproduto indesejado ocorre após rearranjo intermolecular do *O*-acilisourea, apenas no isômero E, quando o par de elétrons do nitrogênio e a carbonila se encontram do mesmo lado da dupla ligação (Esquema 17). A inversão de configuração do isômero Z para o E é catalisada em pH ácido (3-6), mas pode ocorrer lentamente acima de pH 7. No entanto, essa inversão de configuração não se manifesta em pH < 2, uma vez que essas condições favorecem a protonação do *O*-Acilisourea (TSAKOS *et al.*, 2015).

Substituiu-se o DCC por EDC, pois seu subproduto EDU (1-(3-dimetilamino)-propil-3-metilureia), pode ser removido através de extrações aquosas. Entretanto, ao realizar a análise por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Espectros 5 e 6 dos anexos) do produto obtido pela esterificação através de EDC/DMAP verificou-se a formação de outra substância, correspondente à ciclização da molécula de isoniazida, a qual se denominou INH cíclica, que foi obtida como um cristal incolor.

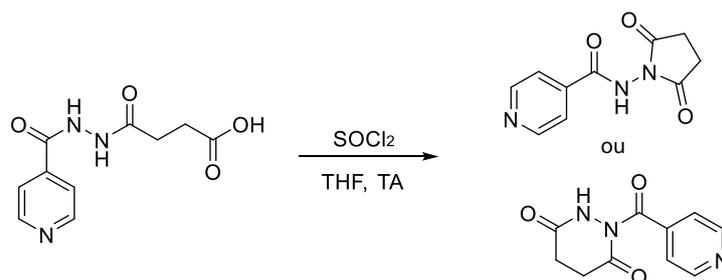
Para investigar em qual etapa ocorreu a formação da ciclização da isoniazida, analisou-se passo a passo a reação, que foi monitorada por CCD, e notou-se comportamento não previsto após adição de DMAP. Inicialmente a reação foi mantida por 40 minutos contendo apenas EDC e hemissuccinamida de isoniazida, sem que se observasse comportamento distinto do normalmente verificado. Contudo, ao adicionar DMAP notou-se a formação de uma mancha de  $R_f$  0,9, semelhante ao que a isoniazida cíclica apresenta. A reação foi interrompida neste instante e o produto obtido foi purificado e analisado por RMN (Espectros 5 e 6 dos anexos), confirmando a ciclização da estrutura. Ao observar este comportamento, supôs-se que durante a formação do intermediário com DMAP (Esquema 18), é possível que ocorra um ataque nucleofílico intramolecular realizado por um dos nitrogênios da hidrazida à carbonila ácida, dando origem à isoniazida

cíclica. Entende-se que os dois nitrogênios podem realizar um ataque nucleofílico à carbonila ativada, que por sua vez pode gerar um ciclo de 5 membros simétrico ou um ciclo de 6 membros assimétrico. Entretanto, o RMN de  $^{13}\text{C}$  revela apenas dois tipos de carbonila em 163 ppm referente à carbonila da isoniazida e em 173 ppm, referente à carbonila succínica ciclizada, indicando a formação de um produto simétrico, no qual as duas carbonilas do ciclo possuem deslocamento químico igual. Esta teoria pode ser comparada com o trabalho realizado por Rando, Brandt e Ferreira (2004). Os autores afirmam terem obtido o ciclo de 6 membros após tentativa de cloração do hemissuccinamida de isoniazida (Esquema 19). A principal evidência citada pelos autores é justamente a presença de 3 picos no RMN de  $^{13}\text{C}$  referente aos três tipos de carbonilas presentes na estrutura. Os autores ainda relatam que foi possível realizar a esterificação desejada a partir da estrutura ciclizada.

Uma possível explicação pela qual o nitrogênio realiza um ataque intramolecular e não o oxigênio do *bis*-MPAp (**12**) como planejado, é devido à maior nucleofilicidade apresentada pela amina quando comparada à hidroxila (TSAKOS *et al.*, 2015). Outro fator que pode ter interferido na esterificação é a baixa solubilidade do hemissuccinamida de isoniazida em acetonitrila, como observado e já citado anteriormente. O composto ciclizado puro foi submetido a ensaios biológicos *in vitro*, mas não demonstrou atividade inibitória frente à cepas de *Mtb*.



Esquema 18 – Mecanismo de formação da INH cíclica.

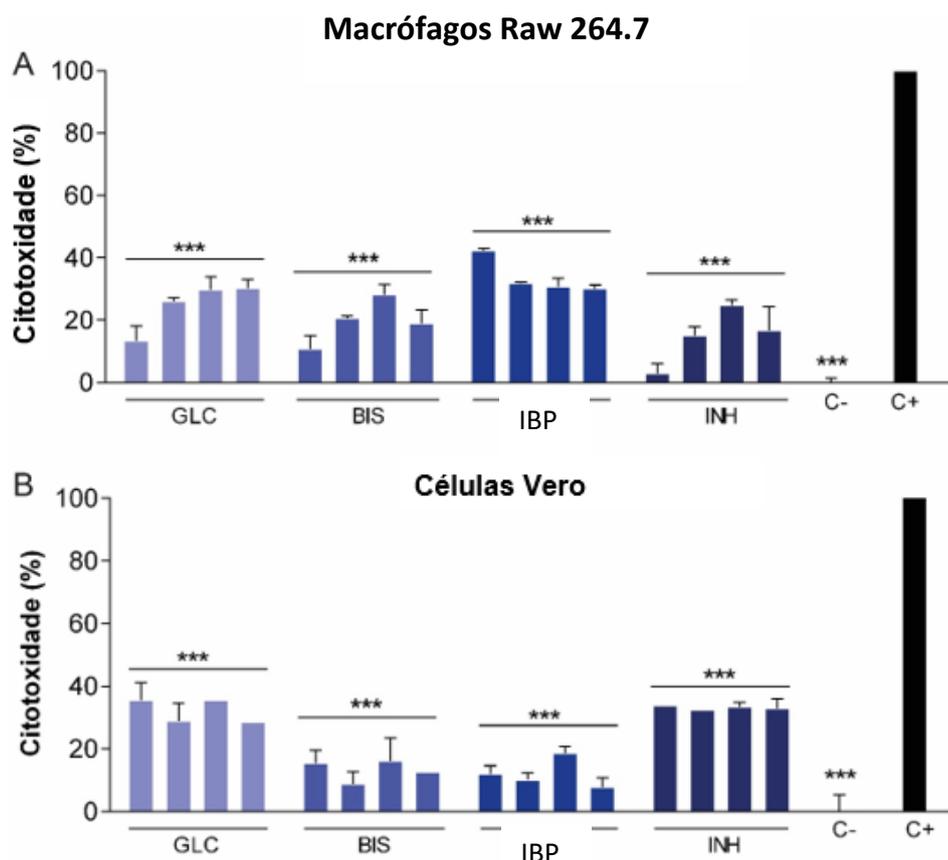


Esquema 19 - Ciclização do hemissuccinamida de isoniazida (RANDO *et al.*, 2004).

## 4.4 Avaliação da atividade biológica

### 4.4.1 Avaliação da citotoxicidade celular

Inicialmente, avaliou-se a citotoxicidade celular das amostras a fim de garantir a seletividade quanto às atividades a serem testadas futuramente. Para isto, utilizou-se cultura de macrófagos murinos Raw 264.7 e células epiteliais de rim de macacos africanos (Células Vero). O método de MTT foi empregado para avaliação da citotoxicidade celular através da atividade mitocondrial das células tratadas ou controles. As células foram tratadas com o dendron de ibuprofeno (**16**) (GLC) sintetizado, o transportador, ácido 2,2-bis-(hidroximetil)-propiónico protegido (**12**) (BIS) sintetizado, ibuprofeno (**5**) (IBP) e isoniazida (**1**) (INH) nas concentrações 125, 62,5, 31,2 e 15,6 µg/mL, previamente estabelecidas. Como resultado, observou-se que em cultura de macrófagos Raw 264.7 e em Células Vero, todas as amostras apresentaram baixo percentual de citotoxicidade em todas as concentrações testadas, quando comparadas ao controle positivo de morte celular (Figura 27 A-B). Estes resultados indicam que as amostras testadas apresentam baixa citotoxicidade celular e estão aptas para outros testes de atividade biológica.

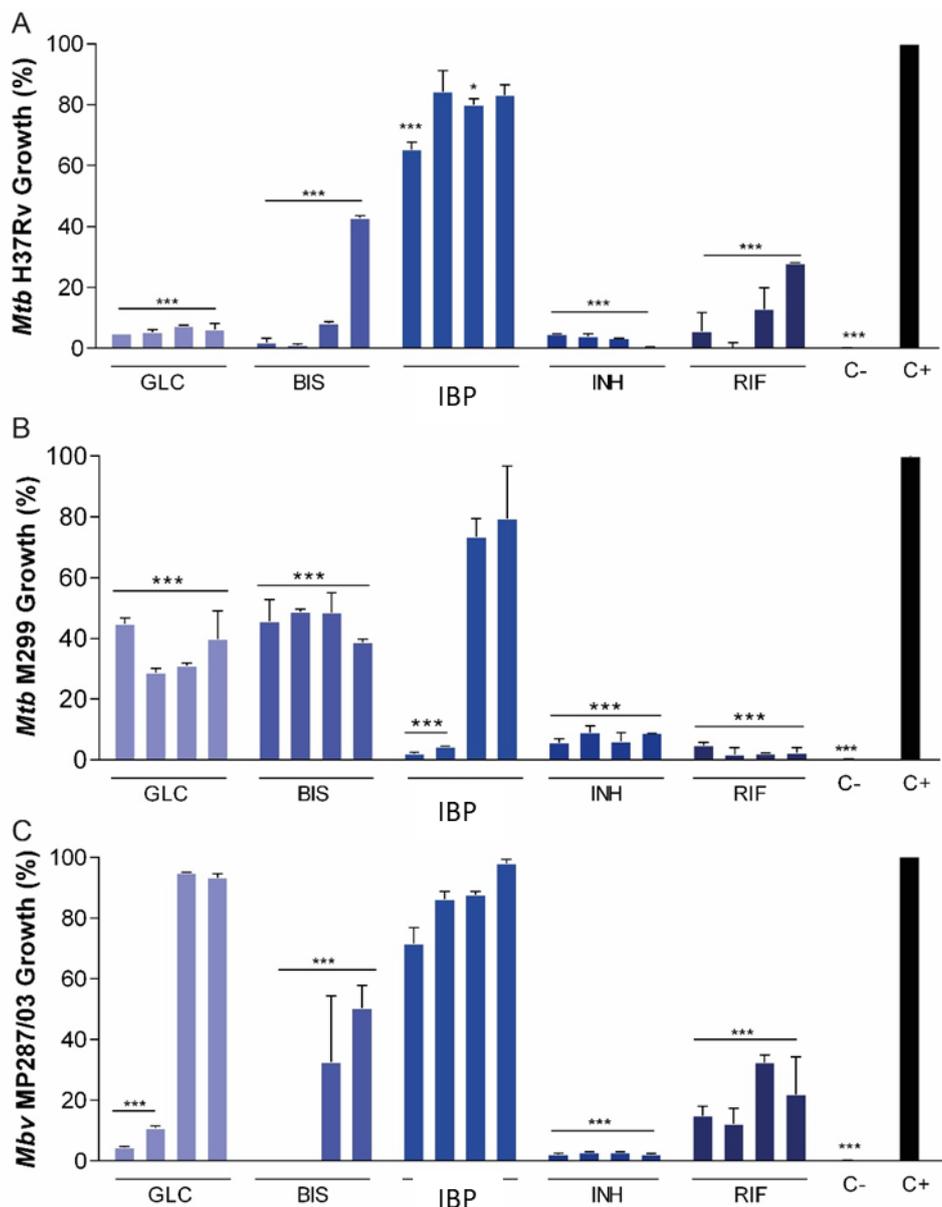


**Figura 27 - Avaliação da citotoxicidade celular em macrófagos RAW 264.7 e Células Vero.** Cultura de macrófagos RAW 264.7 (A) e Células Vero (B) foram plaqueadas ( $5 \times 10^5$  células/mL) e tratadas com as amostras nas concentrações de 125, 62,5, 31,2 e 15,6  $\mu\text{g/mL}$  (mostradas em ordem decrescente no gráfico) por 24 h. O controle negativo (C-) de toxicidade celular foi cultura de macrófagos somente estimulado por LPS e o controle positivo (C+) cultura de macrófagos tratado com 1% de Triton X-100. Os valores são representados como média  $\pm$  desvio padrão e grupos diferentes foram considerados significativos segundo  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) e  $P < 0,001$  (\*\*\*) ( $n=3$ ).

#### 4.4.2 Avaliação da inibição do crescimento das células micobacterianas *Mtb H37Rv*, *Mtb M299* e *Mbv MP287/03*

Utilizando as mesmas concentrações previamente estabelecidas e de baixa citotoxicidade em cultura de macrófagos e de Células Vero, avaliou-se a atividade antimicobacteriana das amostras frente às cepas de diferentes níveis de virulência. A cepa *Mtb H37Rv* é uma cepa padrão de baixa virulência, a cepa *Mtb M299* é hipervirulenta, isolada de humano, e a cepa hipervirulenta *Mbv MP287/03*, isolada de bovino.

Como resultado, o candidato a pró-fármaco GLC (**16**) apresentou elevado potencial ao inibir significativamente o crescimento das cepas *Mtb* H37Rv (MIC<sub>50</sub> 8,1 ± 2.0 µM) e M299 (MIC<sub>50</sub> 11,6 ± 2.1 µM) em todas as concentrações testadas. Apesar disso, considera-se que a inibição do crescimento de H37Rv é mais proeminente e similar ao observado com os fármacos anti-TB INH e RIF. Isto se deve à baixa virulência da cepa H37Rv, o que difere da cepa M299, a qual possui maior resistência. A atividade do GLC (**16**) frente à cepa *Mbv* MP287/03 foi observada somente nas concentrações de 125 e 62,5 µg/mL (MIC<sub>50</sub> 74,4 ± 1.0 µM) (Figura 16 A-C). O transportador BIS (**12**) também se mostrou ativo contra as cepas H37Rv, M299 e MP287/03, respectivamente (MIC<sub>50</sub> 63,3 ± 1.0, 20,5 ± 2.7, 76,2 ± 1.1 µM). Esta atividade foi observada em todas as concentrações, sendo mais proeminente a atividade associada às concentrações 125 e 62,5 µg/mL (Tabela 3). O IBP (**5**) mostrou atividade inibitória de crescimento moderada frente à cepas *Mtb* H37Rv (MIC<sub>50</sub> 118,2 ± 1.5) e M299 (MIC<sub>50</sub> 178,8 ± 1.1). Ressalta-se que a inibição do crescimento na cepa M299 ocorreu somente nas maiores concentrações e IBP (**5**) não mostrou atividade contra a cepa *Mbv* MP2987/03 (Figura 28 A-C e Tabela 3). Ademais, pôde-se observar que o GLC apresentou atividade anti-TB cerca de 15 e 16 vezes mais potente que o fármaco matriz IBP, frente as cepas H37Rv e M299 respectivamente.



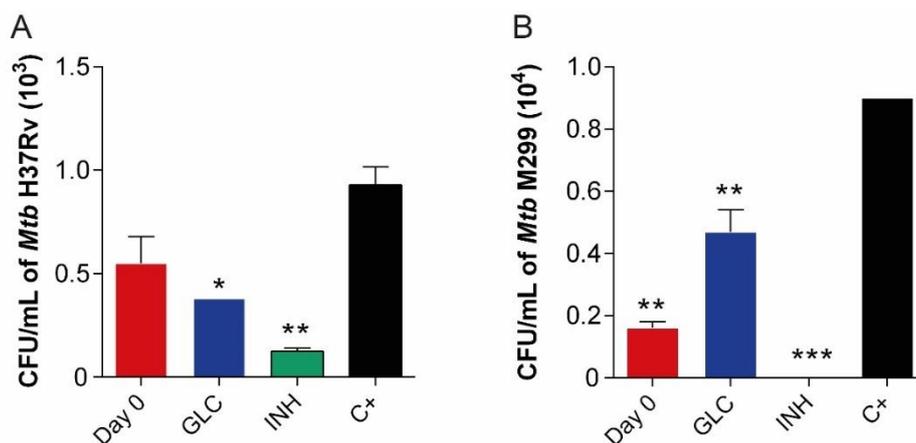
**Figura 28 - Inibição do crescimento das cepas *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* M299 e *M. bovis* MP287/03.** As suspensões bacterianas de *Mtb* H37Rv (A) *Mtb* M299 (B) e *Mbv* MP287/03 (C) ( $1 \times 10^6$  CFU/poço) foram tratadas ou não com as amostras nas concentrações de 125, 62,5, 31,2 e 15,6 µg/mL (mostradas em ordem decrescente no gráfico) durante 7 dias. O fármaco padrão anti-TB, RIF, foi utilizado nas concentrações de 25, 12,5, 6,2, e 3,1 µg/mL para todas as cepas. Como controle negativo (C-) foi utilizado meio 7H9 suplementado e como controle positivo (C+), a suspensão micobacteriana sem tratamento. Os valores são reportados como média  $\pm$  desvio padrão e grupos diferentes foram considerados significativos segundo  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) e  $P < 0,001$  (\*\*\*) ( $n=2$ ).

**Tabela 3.** Concentração inibitória mínima das amostras no crescimento das cepas micobacterianas *Mtb* H37Rv, *Mtb* M299 e *Mbv* MP287/03

Amostras	MIC50 (nM)		
	<i>Mtb</i> H37Rv	<i>Mtb</i> M299	<i>Mbv</i> MP287/03
<b>GLC (16)</b>	8,1 ± 2.0	11,6 ± 2.1	74,4 ± 1.0
<b>BIS (12)</b>	63,3 ± 1.0	20,5 ± 2.7	76,2 ± 1.1
<b>IBP (5)</b>	118,2 ± 1.5	178,8 ± 1.1	225,4 ± 1.1
<b>INH* (1)</b>	31,3 ± 2.9	41,5 ± 2.5	29,8 ± 1.7
<b>Rifampicina* (4)</b>	11,3 ± 1.2	6,3 ± 1.8	7,6 ± 1.5

**\* Fármacos anti-TB**

Após o *screening* inicial das amostras em suspensão bacteriana, seguiu-se avaliando a inibição do crescimento micobacteriano em cultura de macrófagos infectados. Para este experimento, selecionaram-se apenas as duas cepas que causam TB em humanos, *Mtb* H37Rv e M299. Adicionalmente, selecionou-se apenas a maior concentração do GLC (16) (125 µg/mL equivalente a 208 nM) para o tratamento, uma vez que esta foi a que se mostrou mais ativa em todos os testes e não possui alta citotoxicidade em macrófagos e Células Vero. A INH foi utilizada como controle padrão de tratamento da TB. Os resultados demonstram que o GLC (16) é capaz de inibir não somente o crescimento das cepas H37Rv e M299 em suspensão, mas também é capaz de entrar no macrófago infectado e interferir no crescimento micobacteriano dentro do macrófago (Figura 29 A-B). Vale ressaltar que isso ocorre de forma seletiva, sem causar danos ao macrófago, como demonstrado no teste de citotoxicidade. A capacidade inibitória do GLC (16) é proeminente frente a macrófagos infectados com a cepa H37Rv, mas também é significativa contra a cepa hipervirulenta M299. Juntos, estes resultados confirmam a elevada e seletiva atividade antimicobacteriana do GLC (16).



**Figura 29 - Inibição do crescimento das cepas *M. tuberculosis* H37Rv e M299 em cultura de macrófagos infectados.** Macrófagos Raw 264.7 foram plaqueados ( $5 \times 10^5$  células/mL) e infectados com as cepas H37Rv e M299 (MOI 1:1) e tratadas ou não com as amostras na concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$  ou 0,208  $\mu\text{mol}$ . Após 4 dias, a cultura foi lisada com Triton 0,1% e o método de CFU foi utilizado para quantificação da carga bacteriana. A INH foi utilizada como controle de tratamento padrão da TB. Como controle positivo (C<sup>+</sup>) foi utilizada cultura de macrófagos infectados com as cepas e não tratados. Os valores são reportados como média  $\pm$  desvio padrão e grupos diferentes foram considerados significantes segundo  $P < 0,05$  (\*),  $P < 0,01$  (\*\*) e  $P < 0,001$  (\*\*\*) (n=2).

Há necessidade de se esclarecer algumas questões dos ensaios biológicos, como por exemplo elucidar se a atividade de inibição de crescimento de GLC (16) ocorre devido a latenciação do ibuprofeno, originando um pró-fármaco recíproco, uma vez que o *bis*-MPAp (12) também demonstrou atividade de inibição de crescimento. Aventa-se também a possibilidade de GLC (16) atuar como um híbrido molecular caso não ocorra a liberação das duas moléculas de ibuprofeno do transportador de *bis*-MPAp (12). Uma alternativa para elucidar essa questão seria através de estudos de liberação do GLC (16), principalmente como a estrutura se comporta no pH do meio de cultura. Outra alternativa seria analisar o material contido no sobrenadante da cultura por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) e comparar com os resultados de liberação que serão obtidos, dessa forma será possível observar como GLC (16) se encontrará: na forma liberada, caracterizando uma latenciação ou na forma íntegra que caracterizaria um híbrido molecular.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O planejamento dos dendrons de IBP, INH e, posteriormente, dendron misto dirigido de 2ª geração para tuberculose baseou-se nos estudos anteriores (BYRNES *et al.*, 2007; VILAPLANA *et al.*, 2013; MORTENSEN *et al.*, 2019), que citavam a utilização do IBP (5) em sinergia com fármacos de primeira linha no tratamento da tuberculose e nos resultados demonstrados por Guzman e colaboradores (2013), que demonstraram a inibição do crescimento *in vitro* da cepa *Mtb*. A escolha pelo reposicionamento do IBP (5) para o tratamento da tuberculose corrobora o perfil epidemiológico da doença, uma vez que as maiores taxas de incidência se localizam em regiões subdesenvolvidas e em desenvolvimento. O reposicionamento do IBP para tuberculose através de um sistema de transporte dirigido não só diminuiria o custo do desenvolvimento, mas, também, o tempo de desenvolvimento, uma vez que tanto IBP quanto INH já foram aprovados nos testes pré-clínicos e clínicos.

Não foi possível concluir todo planejamento sintético, principalmente devido aos problemas gerados pela pandemia da COVID-19 além das dificuldades sintéticas encontradas durante a síntese do dendron de INH, pela baixa solubilidade desse fármaco em solventes orgânicos. A utilização de DMF como solvente orgânico se mostrou adequada, no entanto salienta-se a dificuldade de extração do produto formado neste meio, bem como remoção do solvente do meio reacional. Ainda assim, sugere-se que a remoção completa do DMF do meio reacional pode favorecer a obtenção do dendron de INH, pois dessa forma se estaria contornando o problema da solubilidade do reagente na metodologia utilizando cloreto de oxalila. Outra possível tentativa de obtenção do dendron de INH seria através da esterificação de Steglich, controlando o pH reacional para que não ocorra a

formação do subproduto indesejado *N*-Aciliureia, como proposto por TSAKOS *et al.*(2015).

A síntese do dendron de IBP protegido (**16**) se mostrou eficiente, quando efetuada através do cloreto de IBP, utilizando o cloreto de oxalila como agente conversor. A mistura de isômeros no produto final (**16**) deixa como perspectiva a tentativa de separação desses isômeros através de purificação em coluna quiral do produto final ou através da separação enantiomérica do reagente de partida, utilizando agente de derivatização quiral. Assim, será possível construir uma relação entre isômeros *vs* atividade biológica.

Salienta-se que este projeto é o primeiro trabalho na literatura que demonstrou atividade inibitória *in vitro* contra tuberculose utilizando estruturas dendriméricas ligadas covalentemente à um composto bioativo, curiosamente o IBU. Os únicos estudos que utilizaram dendrímeros como transportadores de fármacos para TB (BELLINI, 2015; KUMAR, 2006) foram através do encapsulamento da rifampicina como estratégia de transporte. Apesar do *bis*-MPAp (**12**) ser um derivado do *bis*-MPA (**6**), a estrutura protegida é comumente utilizada na construção de polímeros de *bis*-MPA. Entretanto, apresenta-se nesta dissertação o primeiro relato da atividade anti-TB do *bis*-MPAp (**12**) em sua forma não conjugada, uma vez que os trabalhos anteriores relatam atividade antimicrobiana de polímeros derivados de *bis*-MPAp (CARLMARK *et al.*, 2013), mas nenhum deles utilizando apenas um bloco de *bis*-MPAp não conjugado. Ao confrontar os dados da literatura, observou-se também que o IBP foi capaz de inibir o crescimento da cepa *Mtb* H37Rv em concentração menor do que observado por Guzman e colaboradores (2013) (MIC<sub>50</sub> 24.4 ± 1.5 µg/mL *vs* 75 mg/L).

O estudo feito por Guzman *et al.* relata a homologia de um dos alvos do IBP para o *Mtb*, a fim de buscar um possível mecanismo de inibição do crescimento do *Mtb*. Os autores

relatam que um dos alvos do IBP no ser humano é a RHO-GTPase, e através de estudos de homologia feitos pelo grupo, demonstrou-se a existência de um alvo homólogo no *Mtb*, denominado fator de iniciação 2 (IF-2). O IF-2 participa de uma etapa crucial na síntese proteica do *Mtb*, sendo ele responsável pelo reconhecimento e acomodação do fMet-tRNA<sup>fMe</sup> (resíduo inicial da síntese proteica) na subunidade 30S do ribossomo e, também, pela junção da subunidade ribossômica 30S à subunidade 50S, que resulta na formação do complexo de iniciação (IC70S). Este, após a saída do IF-2 irá se maturar no complexo de alongamento (EC70S) dando início à síntese proteica (KALEDHONKAR *et al.*, 2019; SPRINK *et al.*, 2016). No entanto, existem poucos dados na literatura que corroboram a inibição da RHO-GTPase pelo IBP, como sugerido por Guzman e colaboradores. Um dos artigos encontrados relata a inibição da expressão da ROCK1 (Rho-quinase) em ratos em que o IBP foi administrado (PATEL *et al.*, 2016). Portanto, não foi encontrado dado algum na literatura que relate a inibição direta do IBP, apenas inibição modular.

Frente a esse cenário, buscaram-se na literatura possíveis mecanismos pelo qual o IBP exerce seu efeito anti-TB. Assim como Guzman *et al.*, buscamos homólogos de alvos humanos do IBP no *Mtb*. Entre os alvos do IBP em humanos destaca-se a alfa-metilacil-CoA racemase humana (hAMACR), enzima envolvida na biossíntese dos ácidos biliares, através da conversão dos produtos da biodegradação do colesterol (*R*)-estereoisômero em (*S*)-estereoisômero. Essa etapa é chave na produção de ácidos biliares, pois as oxidases responsáveis pela  $\beta$ -oxidação da cadeia lateral do colesterol reconhecem apenas o substrato na forma (*S*) (FERDINANDUSSE *et al.*, 2000). A hAMACR também exerce o papel de conversão do (*R*)(-)-ibuprofeno (biologicamente inativo) na sua forma ativa (*S*)(+)-ibuprofeno (FERDINANDUSSE *et al.*, 2000). Ao buscar um alvo homólogo no *Mtb*, através da ferramenta BLASTp (*protein Basic Local Alignment Search Tool*), foi visto que o *Mtb* possui também uma alfa-metilacil-CoA racemase (mAMACR), que possui 43% de

identidade com a hAMACR. A mAMACR possui papel semelhante no *Mtb*, sendo responsável, também, por racemizar um substrato essencial no biocatabolismo de ésteres do colesterol (SAKAI, *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2015).

Após buscas na literatura, encontraram-se dois grupos que relataram a síntese de inibidores da mAMACR e hAMACR (YEVGLEVSKIS *et al.*, 2018; PAL *et al.*, 2016; PAL *et al.*, 2018). Curiosamente, os autores buscaram possíveis inibidores da hAMACR, uma vez que existem estudos demonstrando que a superexpressão de hAMACR está relacionada a menor expectativa de vida em pacientes com câncer de próstata (KONG *et al.*, 2020; HE *et al.*, 2018). Os autores utilizaram a estrutura cristalografada da mAMACR (PDB:2GCE e 2G04) para o planejamento de possíveis inibidores da hAMACR. Um estudo prévio realizado por Bhaumik (2007) utilizaram-se análogos do substrato da racemase para visualizar os parâmetros de afinidade entre ligante e enzima. O (*R,S*)-ibuprofenoil-CoA, que consiste na ligação covalente do ibuprofeno à estrutura da CoA, foi um dos análogos propostos e cristalografados com o alvo (PDB: 2GCE) (Figura 1 dos anexos), que mostrou afinidade com valores de  $K_d$  de 24.5  $\mu$ M (BHAUMIK *et al.*, 2007). Tanto Pal e colaboradores (2016, 2018) quanto Yevglevskis, Petrova e colaboradores (2018, 2019) utilizam análogos de IBP para avaliar a afinidade e inibição frente à hAMACR e mAMACR. No teste de inibição da hAMACR realizado por Yevglevskis e colaboradores (2018) o (*R,S*)-ibuprofenoil-CoA apresentou  $IC_{50}$  de 540 nM.

Frente aos resultados de inibição obtidos por GLC (**16**) neste trabalho e a “descoberta” de análogos de IBP que possuem alta afinidade pela racemase, hipotetiza-se que a atividade anti-TB de **16** possa ocorrer devido à inibição da mAMACR. Entretanto, algumas questões ainda necessitam ser elucidadas. Abre-se como perspectiva final a possibilidade do nosso composto **16** atuar como pró-fármaco recíproco, no qual o bis-MPAp (**12**), que também mostrou atividade inibitória de crescimento, transporta duas

moléculas de IBP (**5**) para o interior do *Mtb* e também em macrófagos infectados. Outra possibilidade, também, é a possível obtenção de **16** como híbrido molecular, caso a atividade inibitória seja em função da estrutura íntegra de **16**. Ensaio futuros de liberação poderão elucidar essa questão.

Por fim, ressalta-se que esse projeto de mestrado foi capaz de fornecer dados mais concretos quanto ao reposicionamento do IBP como possível fármaco anti-TB, principalmente caso a inibição ocorra através do processo de latência desse fármaco. Uma das possibilidades pelo qual não há estudos que utilizam o reposicionamento do IBP para TB pode ser devido à baixa lipofilicidade apresentada pelo fármaco (logP: 3,97). Ao se conjugarem duas moléculas de IBP (**5**) a um transportador de *bis*-MPA (**12**) originou-se um possível pró-fármaco recíproco, ou, mesmo, híbrido molecular, com maior lipofilicidade (miLogP: 8,38), que pode ter facilitado a permeação do IBP no interior do *Mtb*. Considera-se que os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir para a validação da mAMACR como alvo de fármacos para TB e, também, para validação do reposicionamento do IBP para TB.

Aspecto altamente promissor com relação ao dendron de IBP obtido neste trabalho e a atividade antimicobacteriana observada, é o fato de se ter solicitado registro patente de inovação, em tramitação, junto à AUSPIN – Agência USP de Inovação.

## 6. REFERÊNCIAS

AHUJA SD, ASHKIN D, AVENDANO M, BANERJEE R, BAUER M, BAYONA JN, ET AL. Multidrug resistant pulmonary tuberculosis treatment regimens and patient outcomes: an individual patient data meta-analysis of 9,153 patients. *PloS Medicine*, v. 9, p.1-16, 2012.

ALLAVENA P, CHIEPPA M, MONTI P, PIEMONTI L. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Critical Review in Immunology*, v.24, p.179–192, 2004.

ALIFANO, P.; PALUMBO, C.; PASANISI, D.; TALÀ, A. Rifampicin-resistance, rpoB polymorphism and RNA polymerase genetic engineering. *Journal of biotechnology*, v.202, p.60–77, 2015.

ALMADEN RESEARCH CENTER, California (US). Coady, D.J.; DiPietro, R.A.; Engler, A.C.; Hedrick, J.L.; Chin, W; Lee, A. L. Z.; N, V. W. L.; Ong, Z.Y.; Yang, Y.Y. Antimicrobial cationic polycarbonates. WO2014168771. 16 de outubro de 2014, Disponível em: <https://patents.google.com/patent/WO2014168771A3/en>. Acesso em 29 de março de 2017.

ARAÚJO, R.V.; SANTOS, S.S.; FERREIRA, E.I.; GIAROLLA J. New Advances in General Biomedical Applications of PAMAM Dendrimers. *Molecules*, v.23, n.11, 2018.

ASHBURN, T.T.; THOR, K.B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.3, p.673–683, 2004.

AZAD, A. K.; RAJARAM, M. V. S.; SCHLESINGER, L. S. Exploitation of the macrophage mannose receptor (CD206) in infectious disease diagnostics and therapeutics. *Journal of Cytology & Molecular Biology*, v.1, p. 1000003 2014.

BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; UM, K. S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; DE LISLE, G.; JACOBS, W. R. JR. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis. *Science* (New York, N.Y.), v.263, n.5144, p.227–230, 1994.

BELLINI, G. R.; GUIMARAES, A. P.; PACHECO, M. A. C.; DIAS, D. M.; FURTADO, V. R.; ALENCASTRO, R. B.; HORTA, B. A. C. Association of the anti-tuberculosis drug rifampicin with a PAMAM dendrimer. *Journal of Molecular Graphics*, v.60, p.34-42, 2015.

BERTRAND, T., EADY, N. A., JONES, J. N., JESMIN, NAGY, J. M., JAMART-GRÉGOIRE, B., RAVEN, E. L.; BROWN, K. A. Crystal structure of Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase. *The Journal of biological chemistry*, v.279, n.37, p.38991–38999, 2004.

BHAUMIK, P.; SCHMITZ, W.; HASSINEN, A.; HILTUNEN, J.K.; CONZELMANN, E.; WIERENGA, R.K. The catalysis of the 1,1-proton transfer by alpha-methyl-acyl-CoA racemase is coupled to a movement of the fatty acyl moiety over a hydrophobic, methionine-rich surface. *Journal of Molecular Biology*, v.367, p.1145-61, 2007.

BUSHRA, R.; ASLAM, N. An overview of clinical pharmacology of Ibuprofen. *Oman Medicinal Journal*, v.25, p.155-1661, 2010.

BYRNE, S.T.; DENKIN, S.M.; ZHANG, Y. Aspirin antagonism in isoniazid treatment of tuberculosis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.51, p.794-5, 2007.

BYRNE, S.T.; DENKIN, S.M.; ZHANG, Y. Aspirin and ibuprofen enhance pyrazinamide treatment of murine tuberculosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.59, p.313-6, 2007.

CAPIM, S. L.; GONÇALVES, G. M.; DOS SANTOS, G. C.; MARINHO, B. G.; VASCONCELLOS, M. L. High analgesic and anti-inflammatory in vivo activities of six new hybrids NSAIDs tetrahydropyran derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v.21, p.6003–6010, 2001.

CARLMARK, A.; MALMSTROM, E.; MALKOCH, M. Dendritic architectures based on bis-MPA: functional polymeric scaffolds for application-driven research. *Chemical Society Review*, v. 42, p.5858-5879, 2013.

CHAKRABORTY, S.; RHEE, K.Y. Tuberculosis drug development: history and evolution of the mechanism-based paradigm. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v.5, a021147, 2015.

CHOI-SLEDESKI, Y.M.; WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: WERMUTH, C.G.; ALDOUS, D.; RABOISSON, P.; ROGNAN, D. (Eds.) *The practice of medicinal chemistry*. 4 ed., New York, Academic Press, 2015. p.657-696.

CHUNG, M.; TÁVORA, A.; SILVA, D. A.; et al. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, p. 155–179, 2005.

DAULETBAEV, N.; LAM, J.; EKLOVE, D.; ISKANDAR, M.; LANDS, L.C. Ibuprofen modulates NF- $\kappa$ B activity but not IL-8 production in cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *Respiration*, v.79, p.234-42, 2010.

DEPRÉ, D.P.M.; ORMEROD, D.J.; HORVATH, A. et al. Processes and intermediates for preparing a macrocyclic protease inhibitor of HCV. WO Pat. 157058. 2016.

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

EVANS A. M. Comparative pharmacology of S(+)-ibuprofen and (RS)-ibuprofen. *Clinical Rheumatology*, 20 Suppl 1, S9–S14, 2001.

FAKUNLE, E. S.; LORING, J. F. Ethnically diverse pluripotent stem cells for drug development. *Trends in Molecular Medicine*, v.18, p.709-16, 2012.

FERDINANDUSSE, S.; DENIS, S.; CLAYTON, P. T.; GRAHAM, A.; REES, J. E.; ALLEN, J. T.; WANDERS, R. J. A. Mutations in the gene encoding peroxisomal  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nature Genetics*, v.24, p.188–191, 2000.

FERDINANDUSSE, S.; DENIS, S.; DACREMONT, G.; WATERHAM, H.R.; WANDERS, R.J. Subcellular localization and physiological role of alpha-methylacyl-CoA racemase. *Journal of Lipid Research*, v.41, p.1890-6, 2000.

FUKUDA, T. Biological recognition at interfaces involving dendritic molecules. *Polymer Journal*, v. 51, p.535–546, 2019.

GIAROLLA, J. *Síntese de pró-fármacos dendriméricos potencialmente antichagásicos e leishmanicidas derivados de hidroximetilnitrofurais, 3-hidroxi-flavona e quercetina*. 2012. [Tese de Doutorado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

GOLDE, T.E.; KOO, E.H.; FELSENSTEIN, K.M. OSBORNE, B.A.; MIELE, L.  $\gamma$ -Secretase inhibitors and modulators. *Biochimica & Biophysica Acta*, v.1828, p.2898-907, 2013.

GUZMAN, J.D.; EVANGELOPOULOS, D.; GUPTA, A.; BIRCHALL, K.; MWAIGWISYA, S.; SAXTY, B.; MCHUGH, T. D.; GIBBONS, S.; MALKINSON, J.; BHAKTA, S. Antitubercular specific activity of ibuprofen and the other 2-arylpropanoic acids using the HT-SPOTi whole-cell phenotypic assay. *British Medical Journal*, v.3, e002672, 2013.

GONZAGA, RV. *Pró-fármacos dendriméricos potencialmente cardiovasculares derivados de rosuvastatina e ácido acetilsalicílico: síntese dos respectivos dendrons*, 158p. [Dissertação de Mestrado], Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2017.

HAWKER, C. J.; FRECHÉT, J. M. J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, v.112, p. 7638–7647, 1990.

HE, H. L.; LEE, Y. E.; CHANG, M. T.; SHIUE, Y. L.; CHANG, S. L.; CHEN, T. J.; CHIU, C. T. AMACR overexpression acts as a negative prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *International journal of medical sciences*, v.15, p.638–644, 2018.

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

JIANG, W., WANNER, J., LEE, R. J., BOUNAUD, P.-Y., & BOGER, D. L. Total Synthesis of the ramoplanin A2 and Ramoplanose Aglycon. *Journal of the American Chemical Society*, v.124, p.5288–5290, 2002.

KALEDHONKAR, S.; FU, Z.; CABAN, K.; LI, W.; CHEN, B.; SUN, M.; GONZALEZ, R. L.; FRANK, J. Late steps in bacterial translation initiation visualized using time-resolved cryo-EM. *Nature*, v.570, p.400–404, 2019.

KAPADYIA, B.; RAVAL, N. B.; PATEL, V. MDR and XDR tuberculosis. *Gujarat Medical Journal*, v. 64, p.19-24, 2009.

KAPETANAKI, S.; CHOUCANE, S.; GIROTTO, S.; YU, S.; MAGLIOZZO, R. S.; SCHELVIS, J. P. Conformational differences in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase KatG and its S315T mutant revealed by resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry*, v.42, n.13, p.3835–3845, 2003.

KARUMBI, J.; GARNER, P. Directly observed therapy for treating tuberculosis. *Cochrane Database System Reviews*, v.5, CD003343, 2015.

KAUR, M.; GARG, T.; RATH, G.; GOYA, A.K. Current nanotechnological strategies for effective delivery of bioactive drug molecules in the treatment of tuberculosis. *Therapeutic Drug Carrier Systems*, v.31, p.49–88, 2014.

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

KUMAR P.V.; ASTHANA A.; DUTTA T.; JAIN N.K. Intracellular macrophage uptake of rifampicin loaded mannosylated dendrimers. *Journal of Drug Targeting*, v.14, p.546-56, 2006. doi: 10.1080/10611860600825159.

KONG, G.; LEE, H.; TRAN, Q.; KIM, C.; GONG, N.; PARK, J.; KWON, S.H.; KIM, S.H.; PARK, J. Current Knowledge on the Function of  $\alpha$ -Methyl Acyl-CoA Racemase in Human Diseases. *Frontiers in Molecular Bioscience*, v.14, p.153, 2020.

LAGUERRE, S.; GONZÁLEZ, I.; NOUAILLE, S.; MOISAN, A.; VILLA-VIALANEIX, N.; GASPIN, C.; BOUVIER, M.; CARPOUSIS, A. J.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; GIRBAL, L. Large-Scale Measurement of mRNA Degradation in *Escherichia coli*: To Delay or Not to Delay. *Methods in enzymology*, v.612, p.47–66, 2018.

LEWIS, S. W. Non chromatographic Separation Techniques. *Encyclopedia of Forensic Sciences*, 2<sup>a</sup> edição, p. 621-626, 2013.

LU, R.; SCHMITZ, W.; SAMPSON, N.S.  $\alpha$ -Methyl Acyl CoA Racemase provides *Mycobacterium tuberculosis* catabolic access to cholesterol esters. *Biochemistry*, v.54, p.5669-5672, 2015.

LUONG, D.; KESHARWANI, P.; DESHMUKH, R.; MOHD AMIN, M.; GUPTA, U.; GREISH, K.; IYER, A. K. PEGylated PAMAM dendrimers: Enhancing efficacy and mitigating toxicity for effective anticancer drug and gene delivery. *Acta biomaterialia*, v.43, p.4–29, 2016.

LUTJEN, A. B.; QUIRK, M. A.; KOLONKO, E. M. Synthesis of esters via a greener Steglich esterification in acetonitrile. *Journal of Visualized Experiments*, v.140, e58803, 2018.

MALKOCH, M.; GARCÍA-GALLEGO, S. Bis-MPA Dendrimers and Other Dendritic Polyesters. In: \_\_\_\_\_(org) *Dendrimer Chemistry: Synthetic Approaches Towards Complex Architectures*. 1<sup>a</sup> ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2020. p. 21-57.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tuberculose. Acesso em: 7 de fevereiro de 2019. <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/tuberculose>

MUKHERJEE, S.P.; DAVOREN, M.; BYRNE, H.J. *In vitro* mammalian cytotoxicological study of PAMAM dendrimers – Towards quantitative structure activity relationships. *Toxicology In Vitro*, v. 24, p.1169 – 1177, 2010.

NANJWADE, B.K.; BECHRA, H.M.; DERKAR, G.K.; MANVI, F.V.; NANJWADE, V.K. Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.38, p.185-196, 2009.

PAL, M.; EASTON, N.M.; YAPHE, H.; BEARNE, S.L. Potent dialkyl substrate-product analogue inhibitors and inactivators of  $\alpha$ -methylacyl-coenzyme A racemase from *Mycobacterium tuberculosis* by rational design. *Bioorganic Chemistry*, v.77, p.640-650, 2018.

PAL, M.; KHANAL, M.; MARKO, R.; THIRUMALAIRAJAN, S.; BEARNE, S.L.; Rational design and synthesis of substrate-product analogue inhibitors of  $\alpha$ -methylacyl-coenzyme A racemase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemical Communication (Camb)*, v.52, p.2740-3, 2016.

PATEL, P.; PARIKH, M.; SHAH, H.; GANDHI, T. Inhibition of RhoA/Rho kinase by ibuprofen exerts cardioprotective effect on isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *European Journal of Pharmacology*, v.15, p.791-98, 2016.

PETROVA, Y.D.; WADDA, K.; NATHUBHAI, A.; YEVGLEVSKIS, M.; MITCHELL, P.J.; JAMES, T.D.; THREADGILL, M.D.; WOODMAN, T.J.; LLOYD, M.D. Identification of novel small-molecule inhibitors of  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase (AMACR; P504S) and structure-activity relationships. *Bioorganic Chemistry*, v.92, p.103264, 2019.

PIERATTELLI, R.; BANCI, L.; EADY, N. A.; BODIGUEL, J.; JONES, J. N.; MOODY, P. C.; RAVEN, E. L.; JAMART-GRÉGOIRE, B.; BROWN, K. A. Enzyme-catalyzed mechanism of isoniazid activation in class I and class III peroxidases. *The Journal of biological chemistry*, v.279, n.37, p.39000–39009, 2004.

PUHL, A.C.; MILTON, F.A.; CVORO, A.; SIEGLAFF, D.H.; CAMPOS, J.C.; BERNARDES, A.; FILGUEIRA, C.S.; LINDEMANN, J.L.; DENG, T.; NEVES, F.A.; POLIKARPOV, I.; WEBB, P. Mechanisms of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  regulation by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nuclear Receptor Signaling*, v.13, p. e004, 2015.

PRUSINER, S. B.; SCOTT, M. R.; SUPATTAPONE, S. Method of sterilizing. US. Pat. EP1187622 A1, 2003. 8p.

RAHIM, Z.; NAKAJIMA, C.; RAQIB, R.; ZAMAN, K.; ENDTZ, H. P.; VAN DER ZANDEN, A. G.; SUZUKI, Y. Molecular mechanism of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from Bangladesh. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, v.92, n.6, p.529–534, 2012.

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

RAWAT, R.; WHITTY, A.; TONGE, P. J. The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the Mycobacterium tuberculosis enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, n.24, p.13881–13886, 2003.

SAKAI, Y.; TAKAHASHI, H.; WAKASA, Y.; KOTANI, T.; YURIMOTO, H.; MIYACHI, N.; VAN VELDHoven, PP.; KATO, N. Role of alpha-methylacyl coenzyme A racemase in the degradation of methyl-branched alkanes by Mycobacterium sp. strain P101. *Journal of Bacteriology*, v.186, p.7214-20, 2004.

SANTOS, S.S. *Antichagásicos e leishmanicidas potenciais: estudo das condições de síntese de pró-fármacos dendrímeros de 3-hidroxi-flavona*, 242p. [Tese de Doutorado], Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016.

SÁ, L.D.; SOUZA, K.M.J.; NUNES, M.G.; PALHA, P.F.; NOGUEIRA, J.A.; VILLA, T.C.S. Tratamento da tuberculose em unidade de saúde da família: história de abandono. *Texto Contexto de Enfermagem*, v.4, 712-718, 2007.

SEAWORTH, B.J.; ARMITIGE, L.Y.; GRIFFITH, D.E; First do no harm—adverse events, drug intolerance, and hepatotoxicity: how can we not justify directly observed therapy for treating tuberculosis? *Clinical Infectious Disease*, v.57, p.1063-1064, 2013.

SHIN, D.; REW, Y.; BOGER, D.L. Total synthesis and structure of the ramoplanin A1 and A3 aglycons: two minor components of the ramoplanin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, p.11977-11979, 2004.

SPRINK, T.; RAMRATH, DJ.; YAMAMOTO, H.; YAMAMOTO, K.; LOERKE, J.; ISMER, J.; HILDEBRAND, P.W.; SCHEERER, P.; BÜRGER, J.; MIELKE, T.; SPAHN, C.M. Structures of ribosome-bound initiation factor 2 reveal the mechanism of subunit association. *Science advances*, v.2, e1501502, 2016.

STENSTRÖM, P.; ANDRÉN, O.C.J.; MALKOCH, M. Fluoride-Promoted Esterification (FPE) Chemistry: A robust route to bis-MPA dendrons and their post functionalization. *Molecules*, v.21, p.366, 2016.

SUZUKI, Y.; SHIRAI, M.; ASADA, K.; YASUI, H.; KARAYAMA, M.; HOZUMI, H.; FURUHASHI, K.; ENOMOTO, N.; FUJISAWA, T.; NAKAMURA, Y.; INUI, N.; SHIRAI, T.; HAYAKAWA, H.; SUDA, T. Macrophage mannose receptor, CD206, predict prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. *Scientific reports*, v.8, n.1, p.13129, 2018.

TAYLOR, P.R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H.H.; BROWN, G.D. et al. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology*, v.23, p.901–944, 2005.

TB ALLIANCE. Why new TB drugs? Disponível em: <<http://www.tballiance.org/why-new-tb-drugs/global-pandemic>>. Acesso em: 20 de junho de 2020.

TESTER, R.F.; KARKALAS, J. Carbohydrates: classification and properties. In: CABALLERO, Benjamin. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2. ed. Maryland: Academic Press, 2003. p. 862-875. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012227055X001668?via%3Dihub>. Acesso em: 10 de Janeiro de 2021.

TOMALIA, D.A.; BAKER, H.; DEWALD, J.; HALL, M.; KALLOS, G.; MARTIN, S.; ROECK, J.; RYDER, J.; SMITH, P. A new class of polymers: starburst dendritic macromolecules. *Polymer Journal*, v.17, p.117-132, 1985.

TSAKOS, M.; SCHAFFERT, E. S.; CLEMENT, L. L.; VILLADSEN, N. L.; POULSEN, T. B. Ester coupling reactions--an enduring challenge in the chemical synthesis of bioactive natural products. *Natural Product Reports*, v.32, n.4, p.605–632, 2015.

UNAIDS. Tuberculosis. <http://www.unaids.org/en/topic/tuberculosis>\_ Acessado: 10 de dez de 2020

UNISSA, A. N.; SUBBIAN, S.; HANNA, L. E.; SELVAKUMAR, N. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, v.45, p.474–492, 2016.

VILAPLANA, C.; MARZO, E.; TAPIA, G.; DIAZ, J.; GARCIA, V.; CARDONA, P.J. Ibuprofen therapy resulted in significantly decreased tissue bacillary loads and increased survival in a new murine experimental model of active tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases*, 208(2), p.199-202, 2013.

WANG, D; ZHU, N.; CHEN, P.; LIN, Z.; LIU, G. Enantioselective decarboxylative cyanation employing cooperative photoredox catalysis and copper Catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, v.139, p.15632–15635, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Standard treatments regiments. *Treatment of tuberculosis Guidelines*. Geneva: WHO, 2010. p.29-42.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global tuberculosis report 2018*, Geneva, WHO, 2018, 277p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global tuberculosis report 2019*, Geneva, WHO, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global tuberculosis report 2020*, Geneva, WHO, 2020.

YADAV, M. R. et al. Synthesis of new chemical entities from paracetamol and NSAIDs with improved pharmacodynamic profile. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.14, p.8701–8706, 2006.

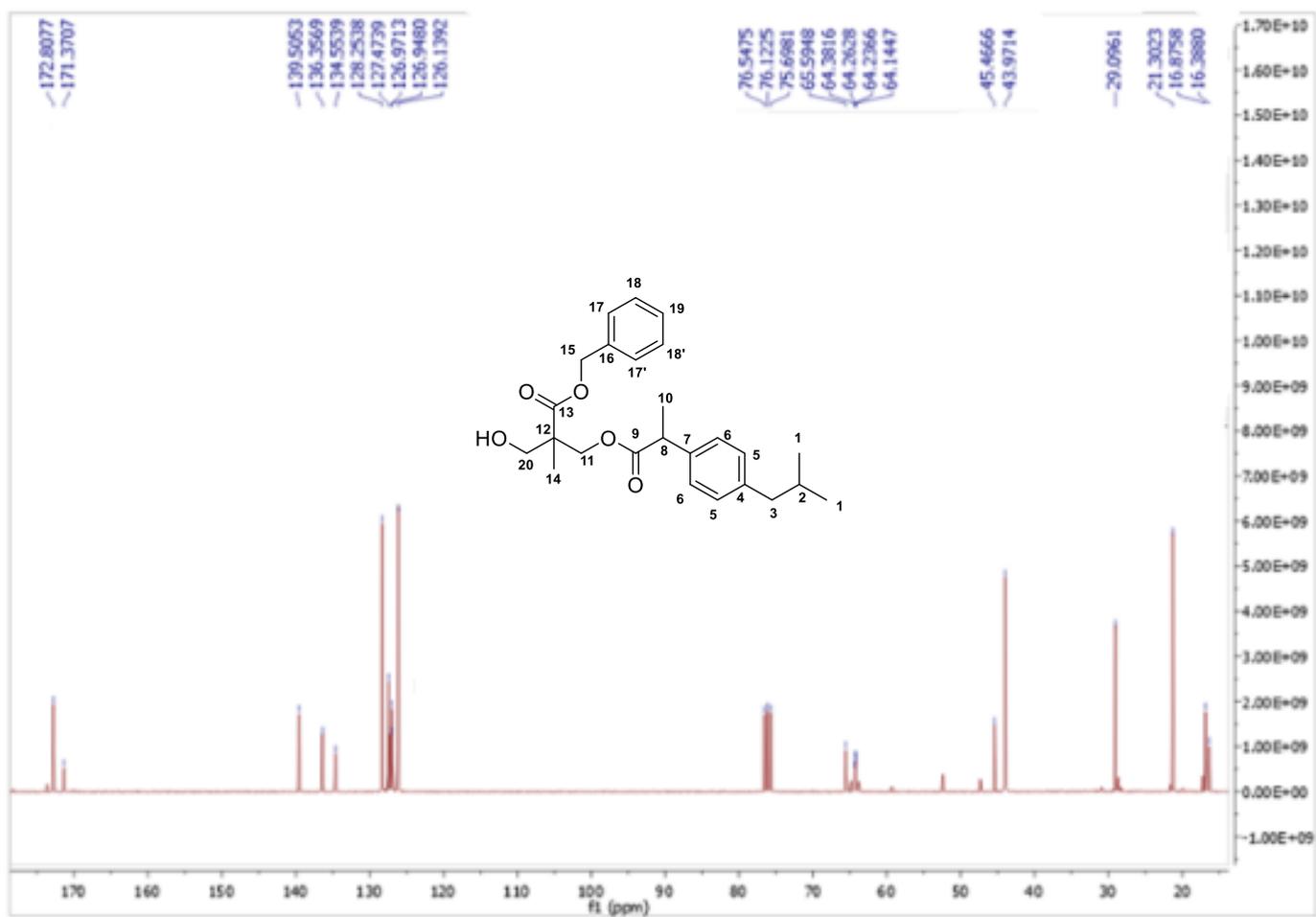
YANG, T. W.; PARK, H. O.; JANG, H. N.; YANG, J. H.; KIM, S. H.; MOON, S. H.; BYUN, J. H.; LEE, C. E.; KIM, J. W.; KANG, D. H. Side effects associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis at a tuberculosis referral hospital in South Korea: A retrospective study. *Medicine*, v.96, p.e7482, 2017.

YEOH, K. K.; CHAN, M. C.; THALHAMMER, A.; DEMETRIADES, M.; CHOWDHURY, R.; TIAN, Y. M.; STOLZE, I.; MCNEILL, L. A.; LEE, M. K.; WOON, E.; MACKEN, M. M.; KAWAMURA, A.; RATCLIFFE, P. J.; MECINOVIĆ, J.; SCHOFIELD, C. J. Dual-action inhibitors of HIF prolyl hydroxylases that induce binding of a second iron ion. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v.11, p.732–745, 2013.

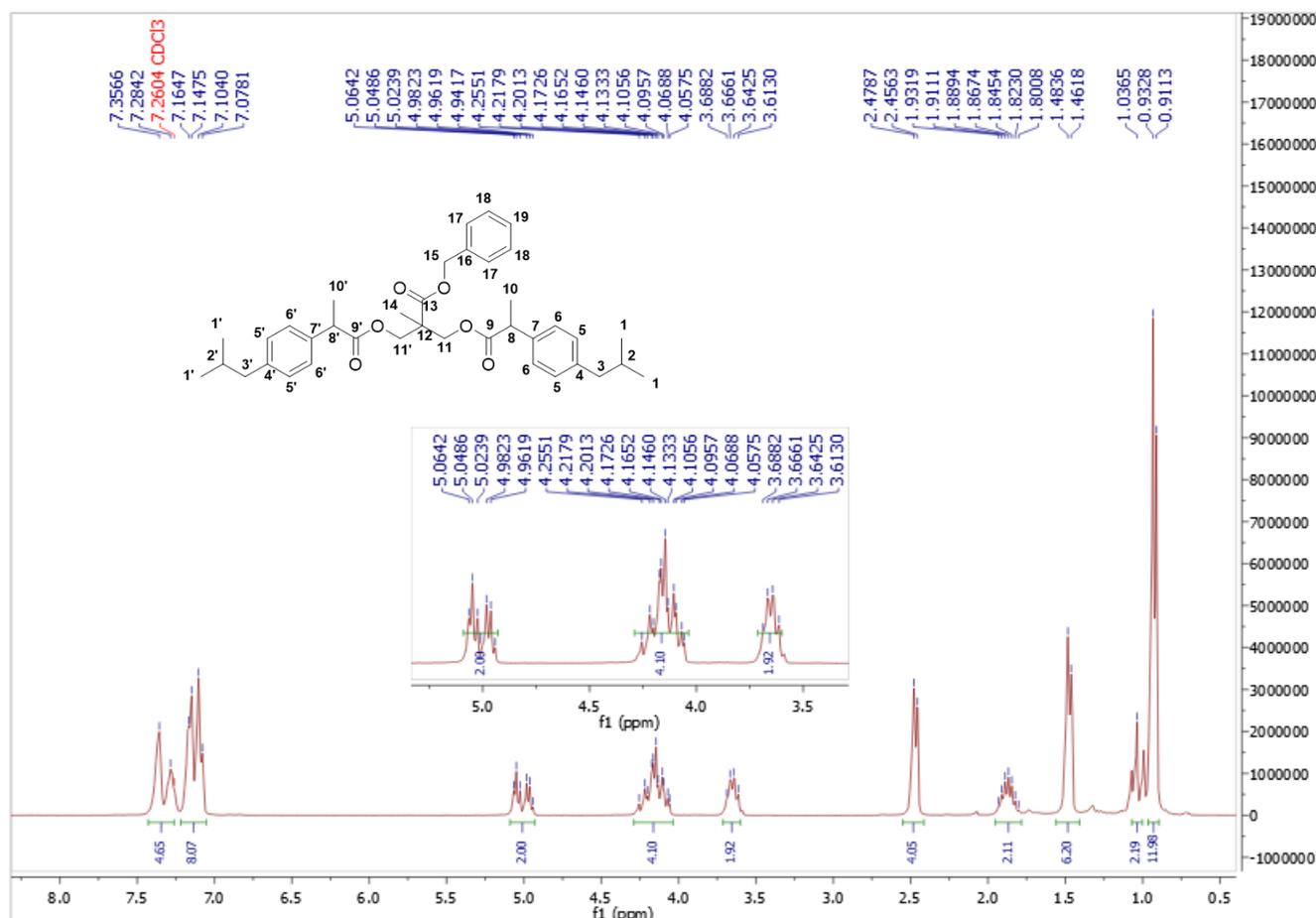
YEVGLEVSKIS, M.; LEE, G.L.; NATHUBHAI, A.; PETROVA, Y.D.; JAMES, T.D.; THREADGILL, M.D.; WOODMAN, T.J.; LLOYD, M.D.; Structure-activity relationships of rationally designed AMACR 1A inhibitors. *Bioorganic Chemistry* v.79, p.145-154, 2018.

ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology*, v.45, p.529-564, 2005.

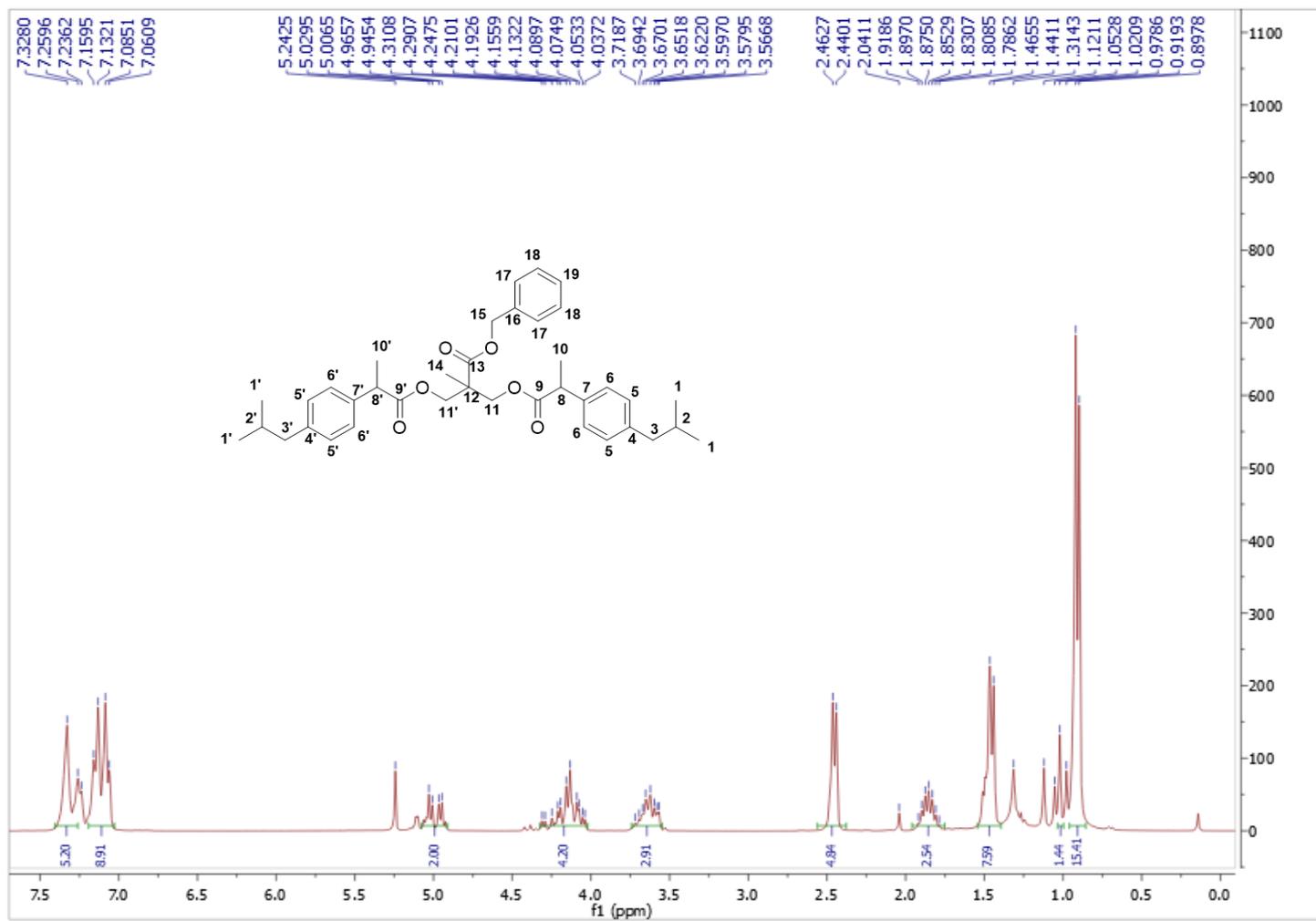
## ANEXOS



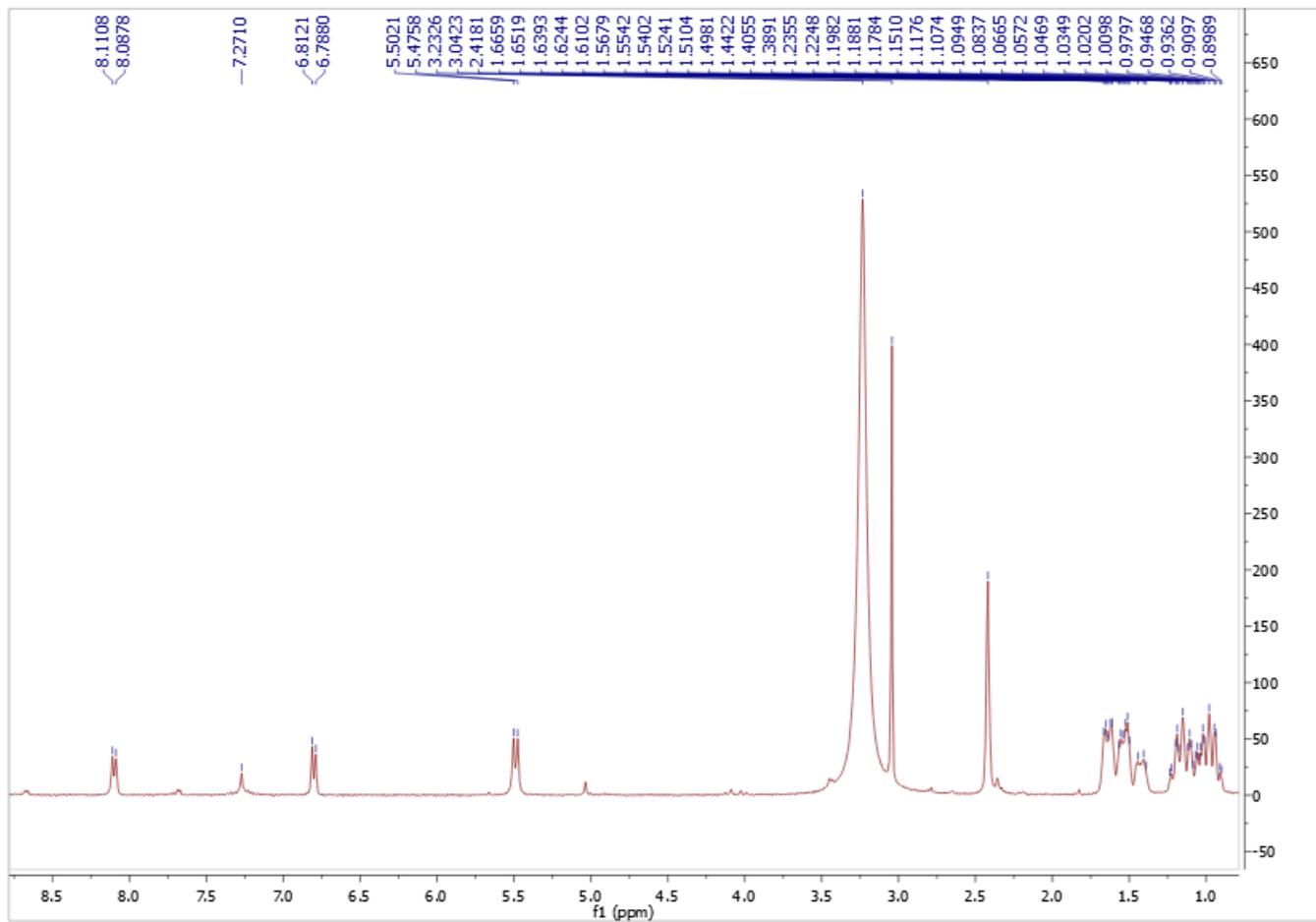
**Espectro 1** - RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do dendron de ibuprofeno monossustituído.



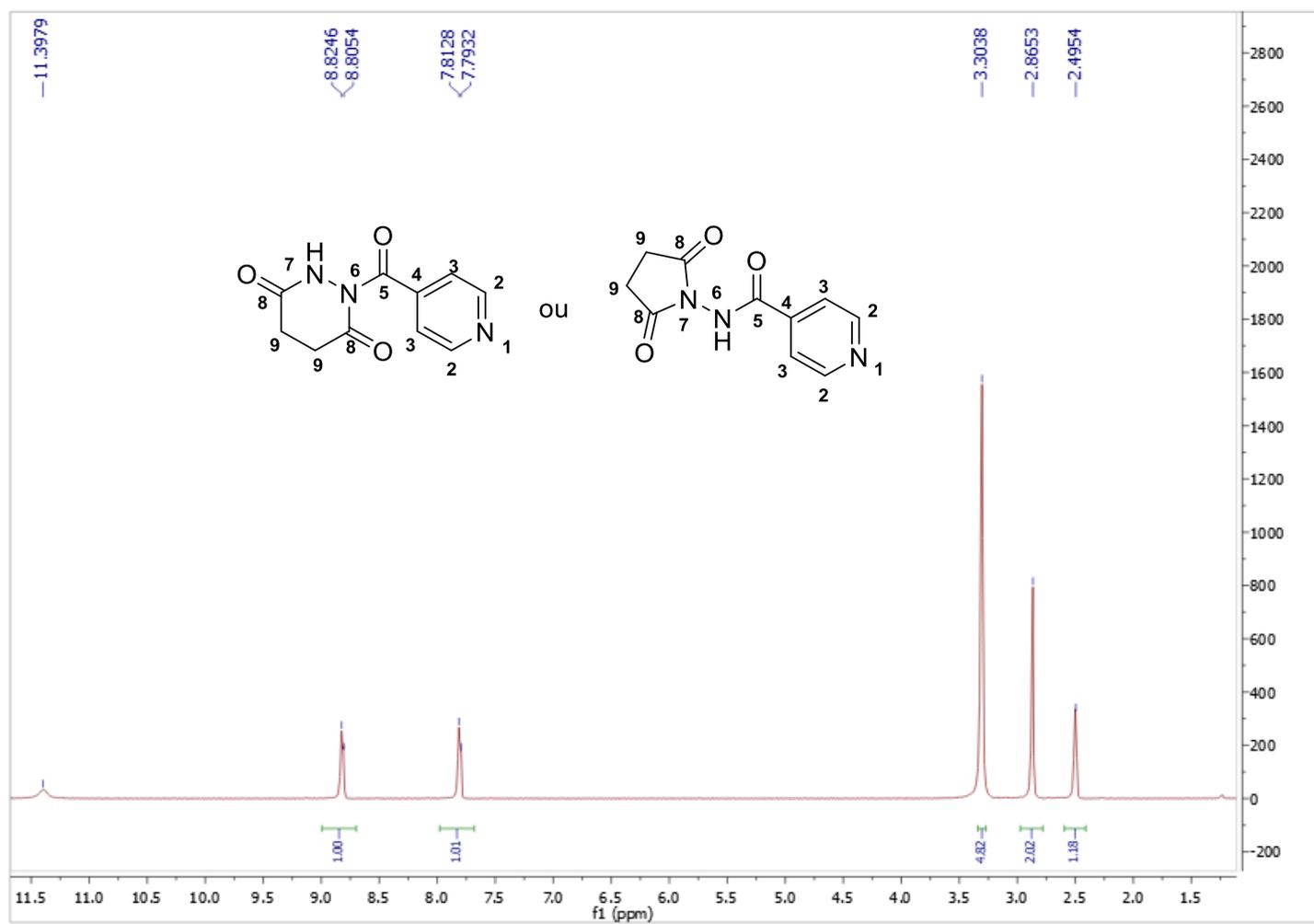
**Espectro 2 - RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) do produto B.**



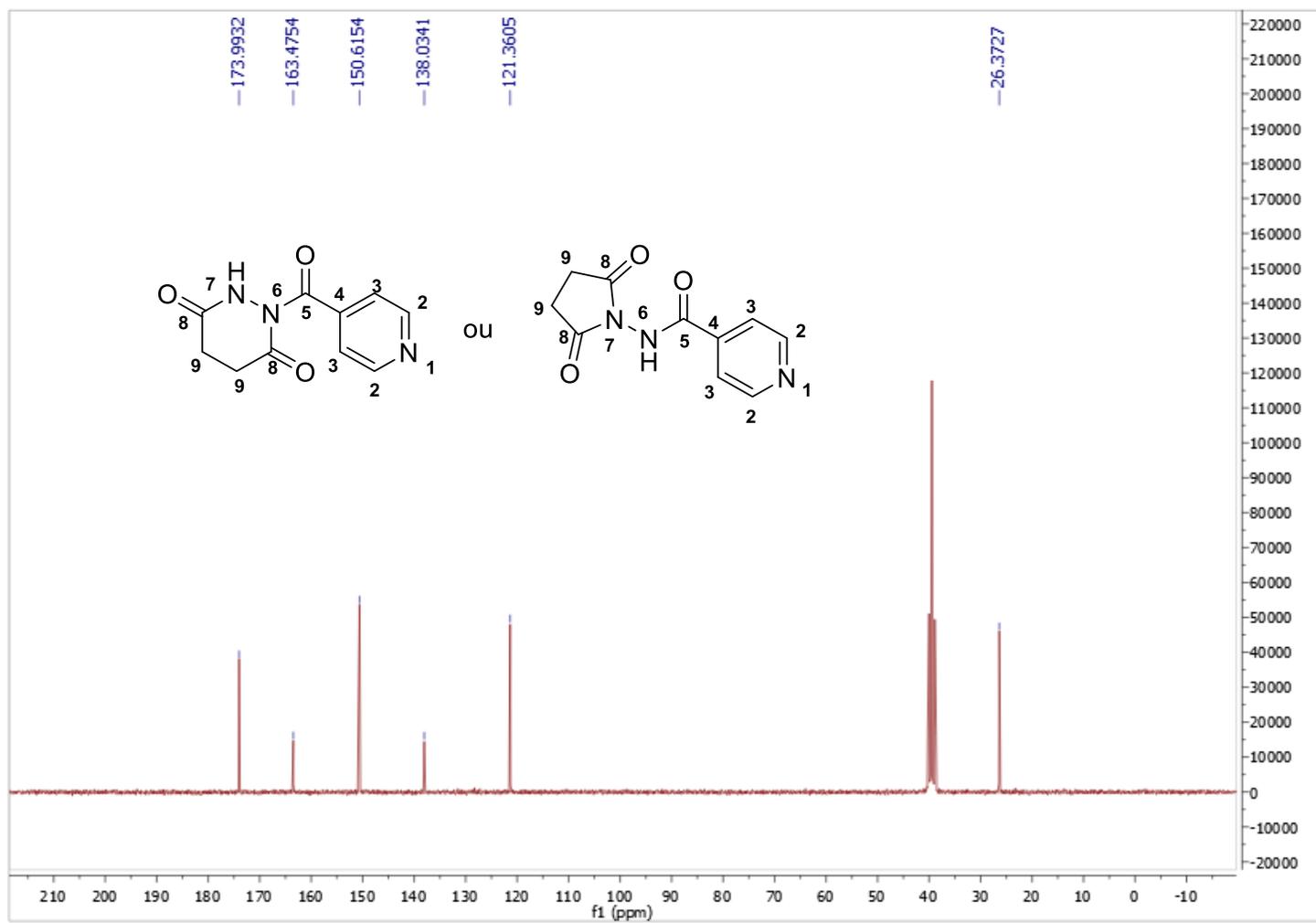
**Espectro 3** - RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) do dendron de ibuprofeno impuro.



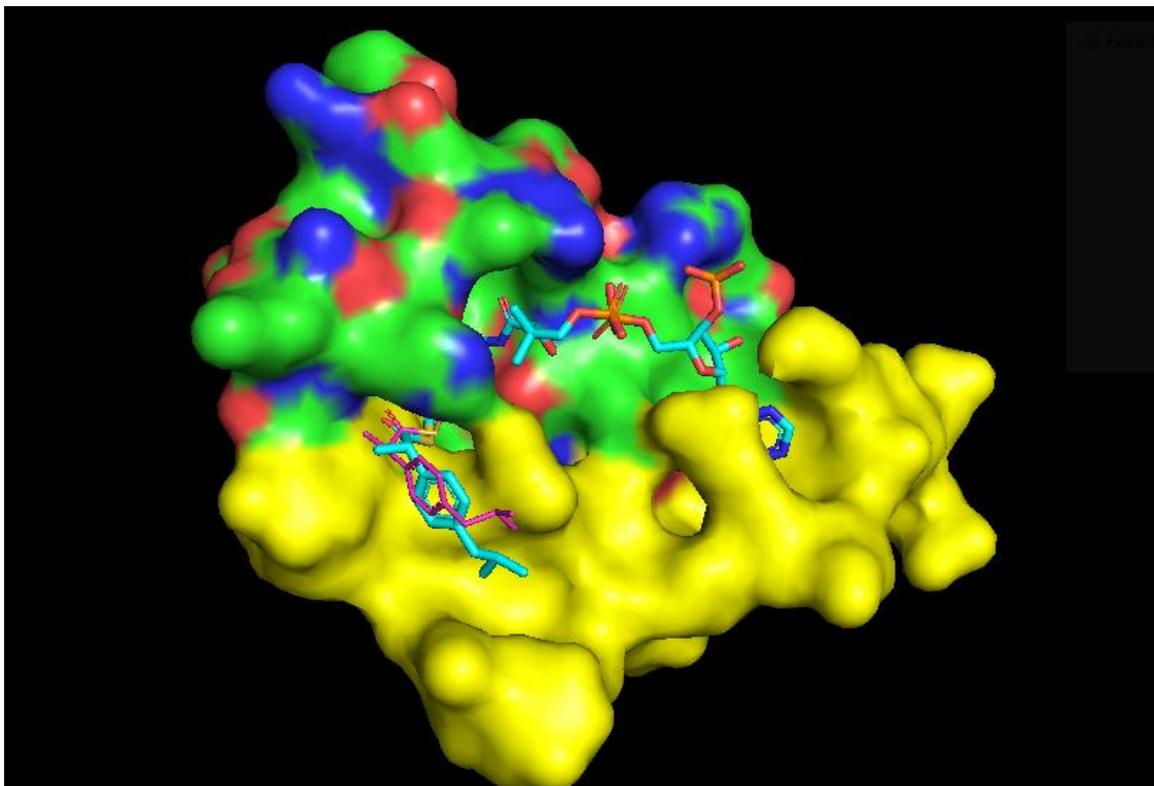
**Espectro 4.** RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz) do subproduto *N*-aciliureia.



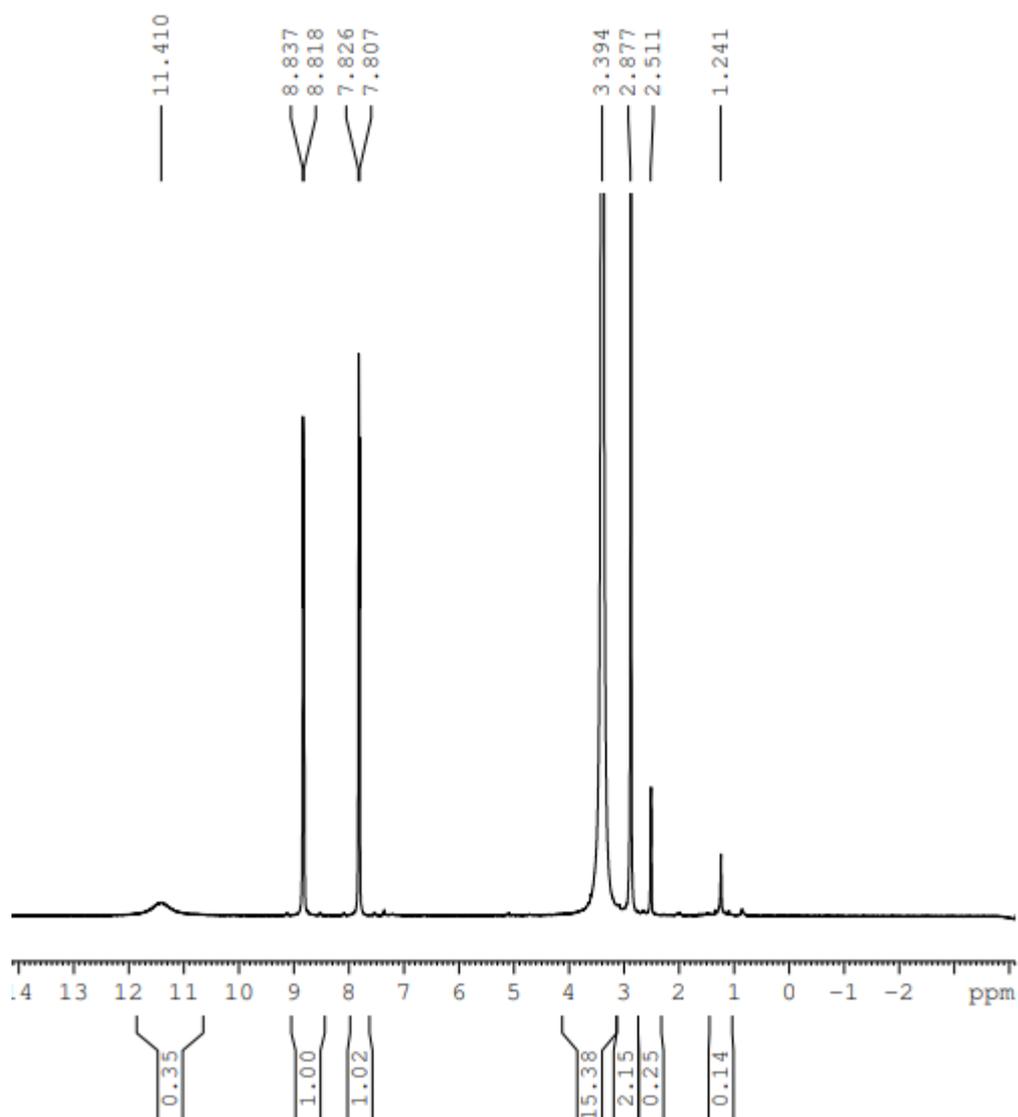
**Espectro 5** - RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz) da INH cíclica.



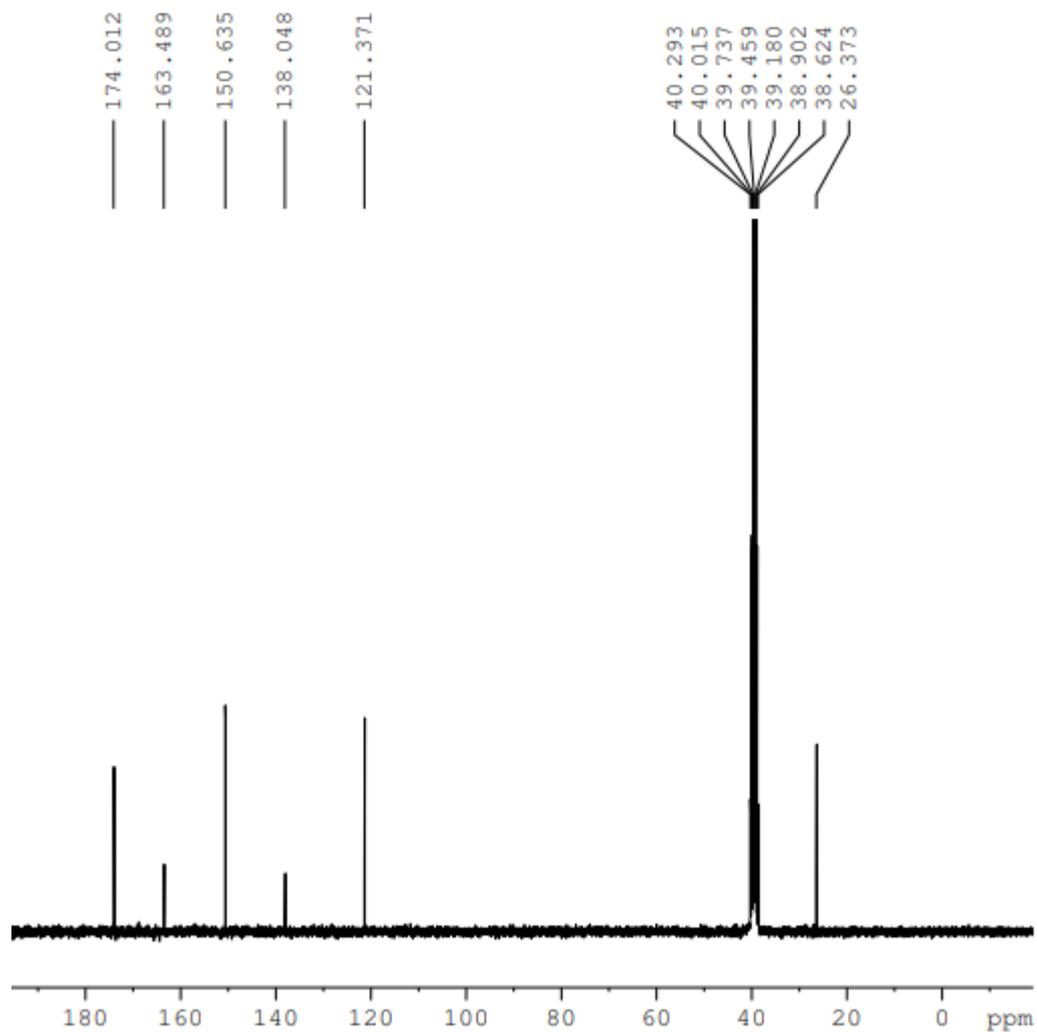
**Espectro 6 - RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $\text{d}_6$ , 75 MHz) da INH cíclica.**



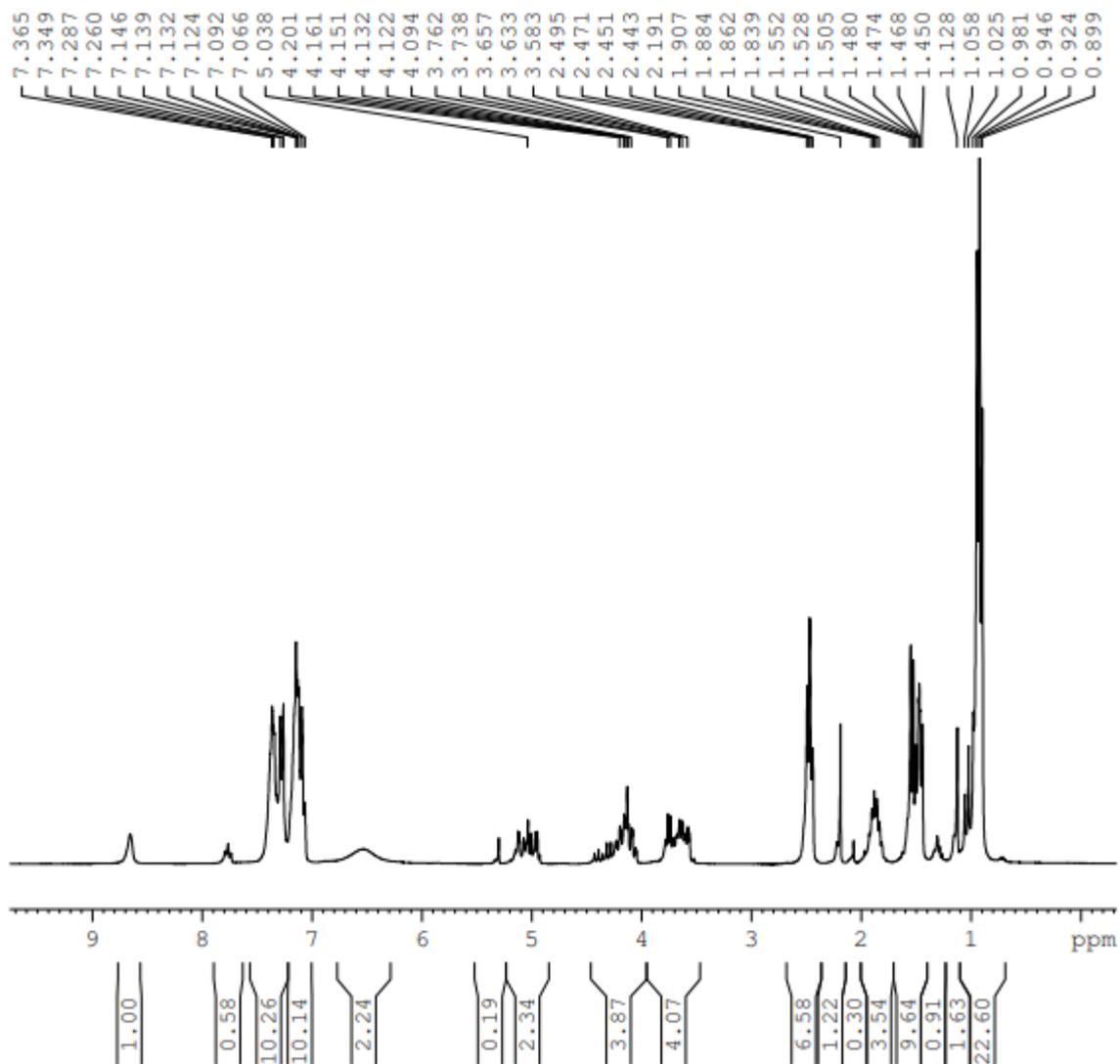
**Figura 1** – Estereovista mostrando a sobreposição dos substratos (2*S*) (ciano) e (2*R*) (magenta) -ibuprofenoil-CoA ligados no sítio ativo da mAMACR (PDB 2GCE).



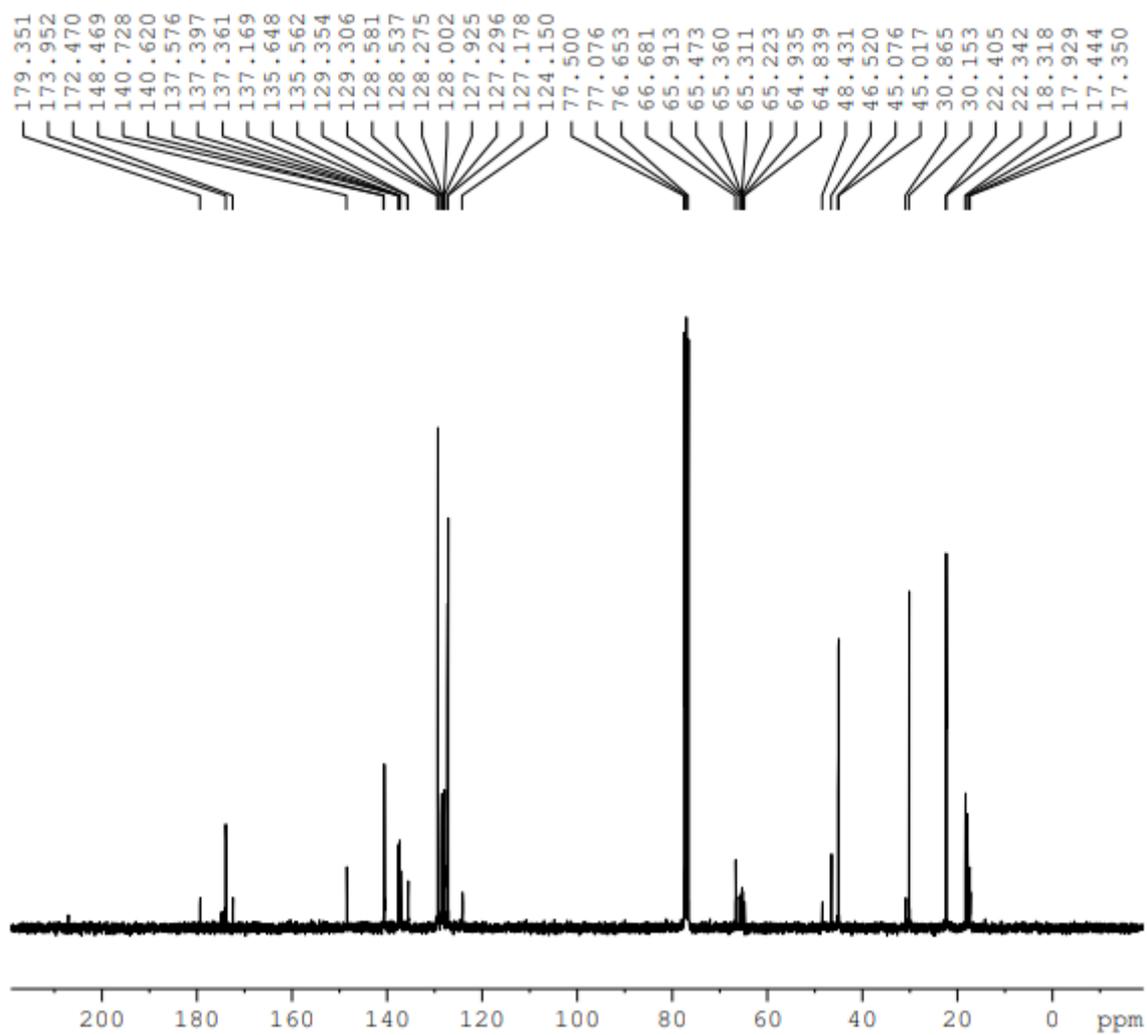
**Espectro 7** – RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz) tentativa de síntese do dendron de isoniazida.



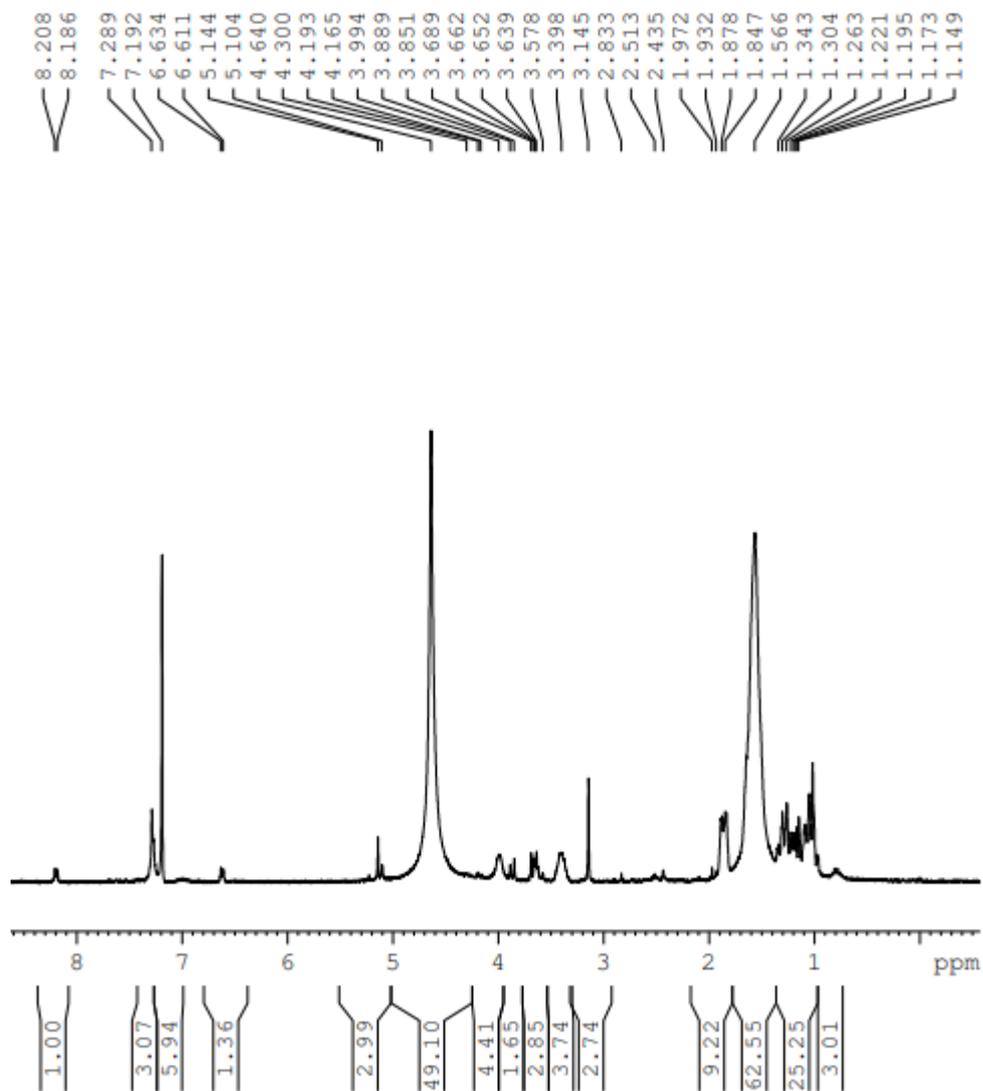
**Espectro 8** – RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 75 MHz) tentativa de síntese do dendron de isoniazida.



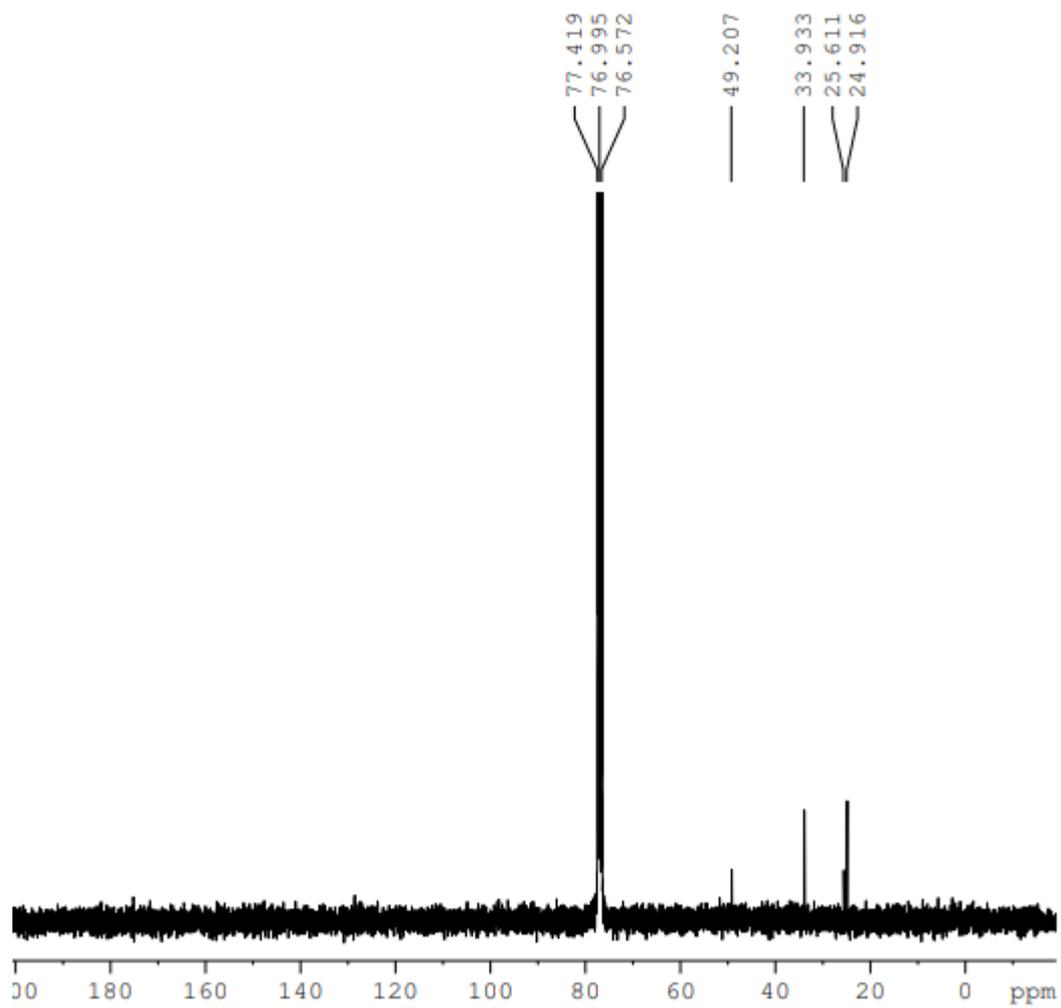
**Espectro 9** - RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do dendron de ibuprofeno impuro.



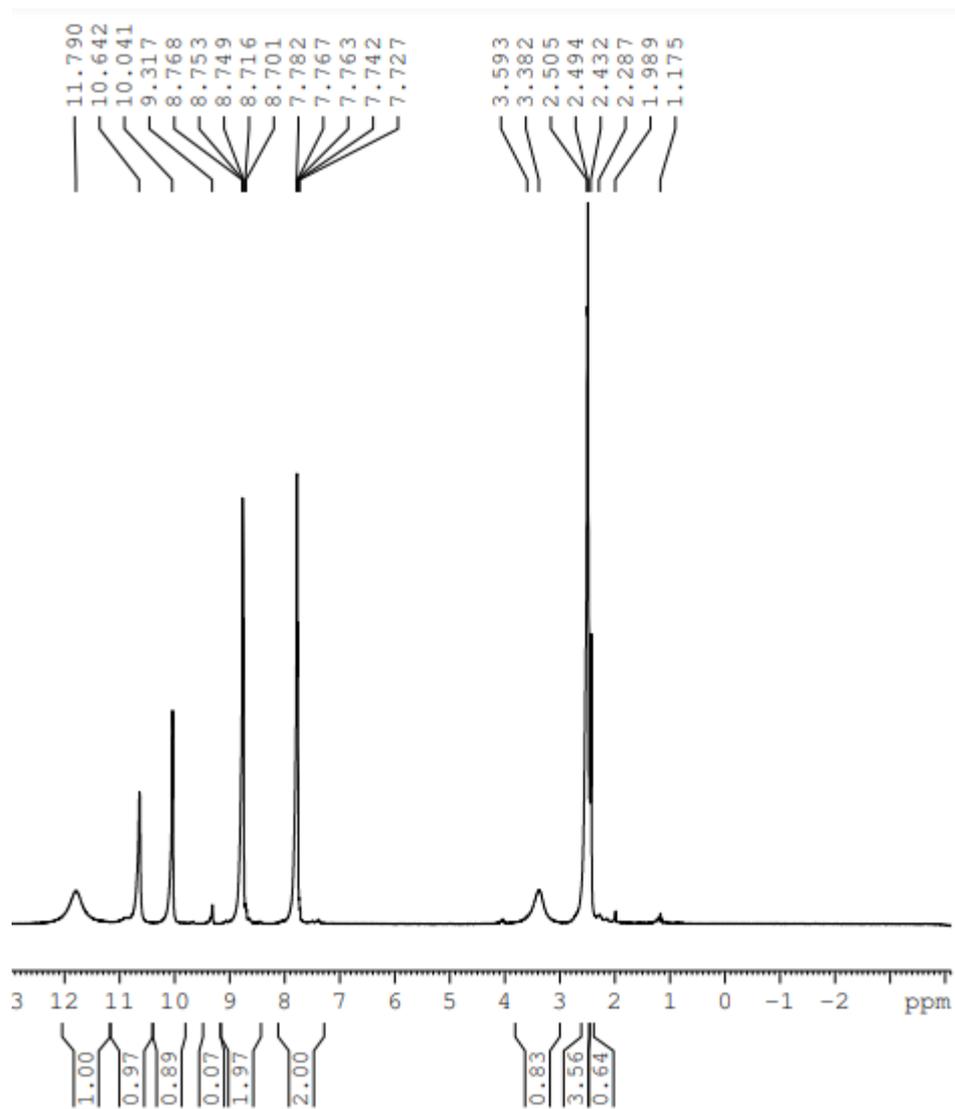
**Espectro 10** - RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do dendron de ibuprofeno impuro.



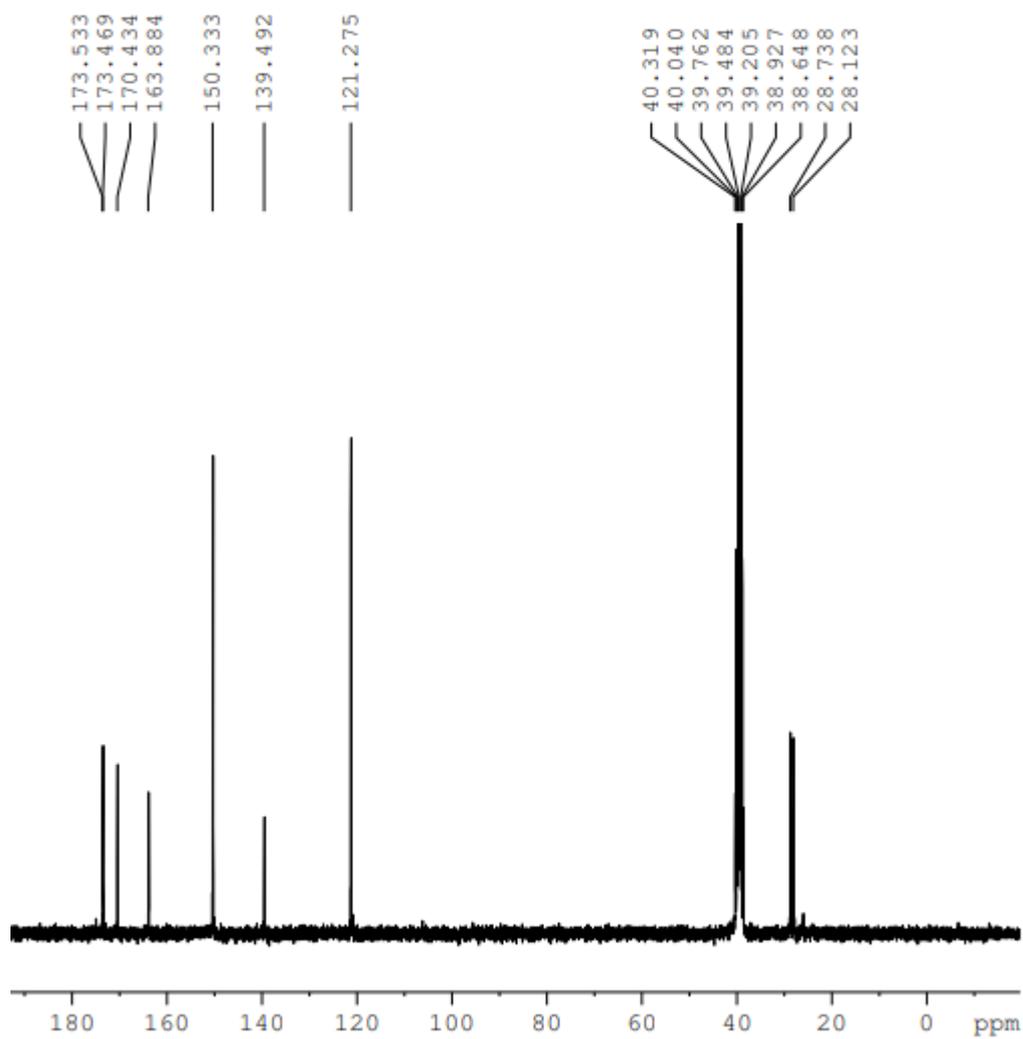
**Espectro 11** – RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) tentativa de síntese do dendron de isoniazida.



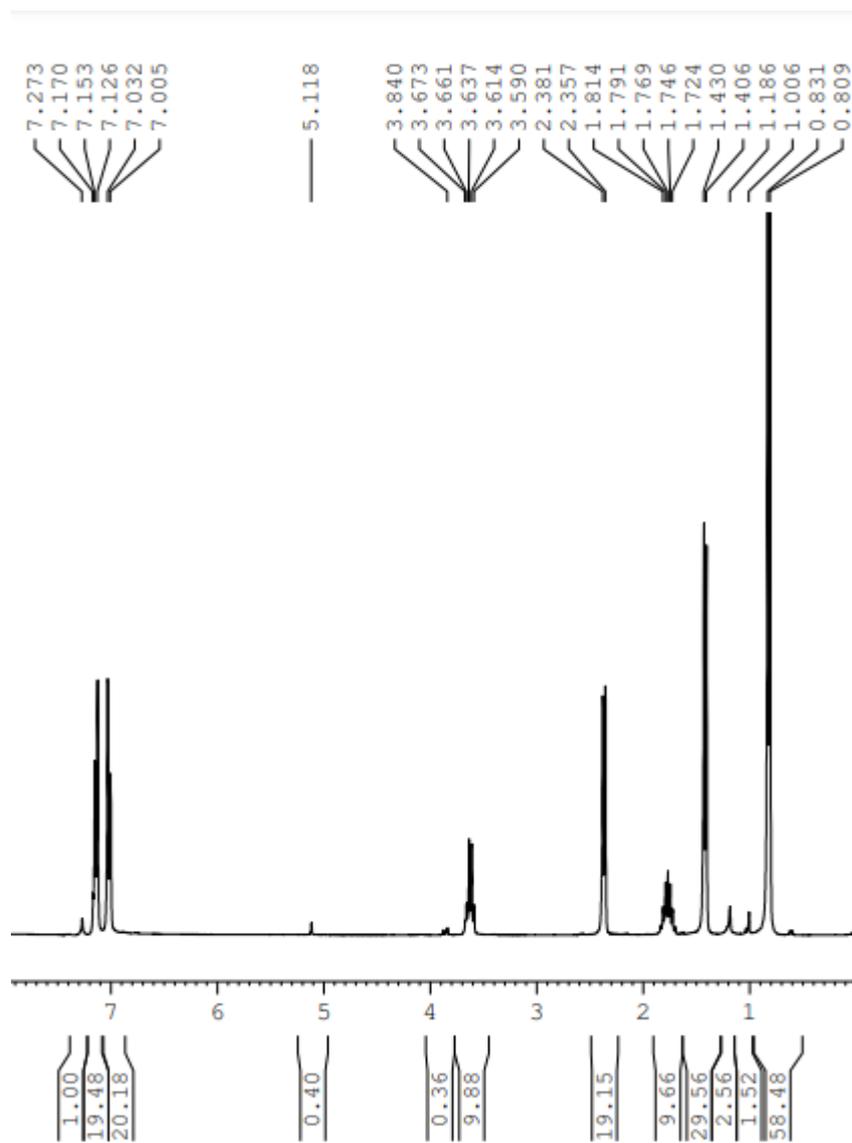
**Espectro 12** – RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) tentativa de síntese do dendron de isoniazida.



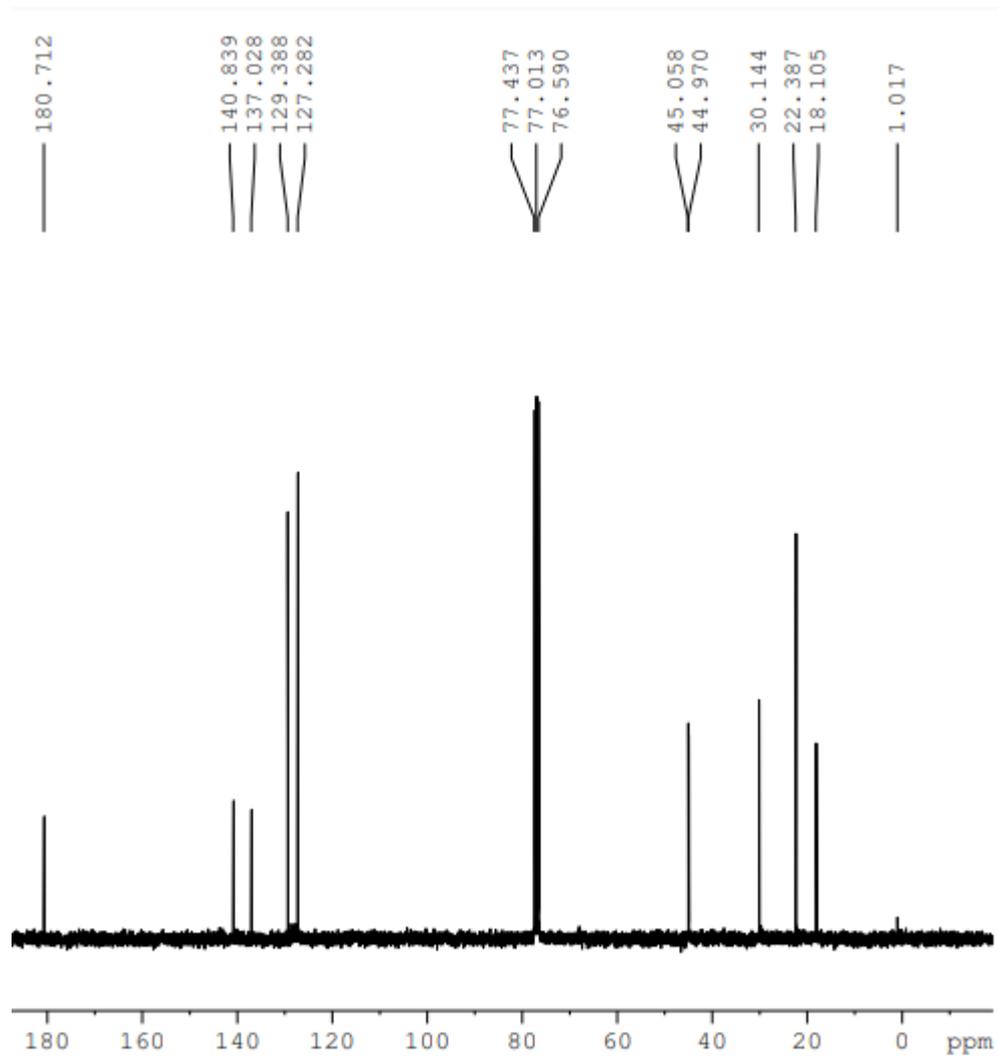
**Espectro 13** - RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz) hemissuccinamida de isoniazida impuro.



**Espectro 14** - RMN  $^{13}\text{C}$  (DSMO- $d_6$ , 75 MHz) hemissuccinamida de isoniazida impuro.



**Espectro 15** – RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) do Ibuprofeno.



**Espectro 16** – RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do Ibuprofeno.