

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Insumos Farmacêuticos

Potenciais inibidores de di-idrofolato redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (*MtDHFR*): *Docking* molecular, síntese e avaliação enzimática de derivados dos ácidos aminobenzóico e *p*-aminocinâmico

Vitor de Bastos Navarousckas

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo  
2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Insumos Farmacêuticos

Potenciais inibidores de di-idrofolato redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (*MtDHFR*): *Docking* molecular, síntese e avaliação enzimática de derivados dos ácidos aminobenzóico e *p*-aminocinâmico

Vitor de Bastos Navarousckas

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo  
2022

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

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

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

N319p Navarausckas, Vitor de Bastos  
Potenciais inibidores de di-idrofolato redutase de Mycobacterium tuberculosis (MtDHFR): Docking molecular, síntese e avaliação enzimática de derivados dos ácidos aminobenzóico e p-aminocinâmico / Vitor de Bastos Navarausckas. - São Paulo, 2022.  
73 p.

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

1. Química farmacêutica e medicinal. 2. Tuberculose. 3. Dihidrofolato redutase. 4. Modificações moleculares. 5. Bioisosterismo. I. T. II. Parise Filho, Roberto, orientador.

Vitor de Bastos Navarousckas

Potenciais inibidores de di-idrofolato redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (MtDHFR): *Docking* molecular, síntese e avaliação enzimática de derivados dos ácidos aminobenzóico e *p*-aminocinâmico

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Roberto Parise Filho  
Orientador/presidente

---

1º. examinador

---

2º. examinador

---

3º. examinador

São Paulo, 04 de Maio de 2022.

## RESUMO

NAVARAUSCKAS, V. B. **Potenciais inibidores de di-idrofolato redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (MtDHFR): Docking molecular, síntese e avaliação enzimática de derivados dos ácidos aminobenzoico e *p*-aminocinâmico.** 2022. 130f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A tuberculose é um problema de saúde mundial que apresenta comorbidade com a AIDS, atingindo anualmente 10 milhões de seres humanos e ocasionando 1,6 milhão de mortes por ano. Devido ao tratamento ser extenso, com custo elevado e com inúmeros eventos adversos, cepas resistentes à quimioterapia estão surgindo. Este cenário estimula a busca por novos fármacos mais eficazes e, também, menos tóxicos. Enzimas como a di-idrofolato redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (MtDHFR) são essenciais para a replicação do agente patológico e apresentam diferenças estruturais significativas quando comparadas à humana. Neste contexto, a pesquisa de análogos do ácido 3-metilfenilamino benzoico e moléculas semelhantes ao ácido *p*-aminodi-idrocinâmico capazes de inibir a MtDHFR torna-se de grande interesse. Quatro séries e um total de 64 novas moléculas foram planejadas por meio de modificações moleculares como introdução de grupos volumosos, retroisosterismo e extensão da cadeia com o objetivo de otimizar a atividade do ácido 3-metilfenilamino benzoico e verificar a eficiência da utilização do ácido *p*-aminodi-idrocinâmico como esqueleto estrutural. As moléculas foram submetidas a estudos *in silico* de ancoragem molecular com a enzima MtDHFR, nos quais verificou-se que as modificações propostas resultaram em aparente melhoria na interação com o sítio catalítico e possível aumento de seletividade. No entanto, apenas uma molécula da série 2 foi obtida com rendimento global de 5%, a qual foi amplamente caracterizada por técnicas espectroscópicas e de pureza. O composto obtido será avaliado em suas versões ácido e éster quanto a capacidade inibitória contra as enzimas MtDHFR e hDHFR.

**Palavras-chave:** Química farmacêutica e medicinal; Tuberculose; Di-idrofolato redutase;

MtDHFR; Modificações moleculares; Bioisosterismo

## ABSTRACT

NAVARAUSCKAS, V. B. **Potential *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase (MtDHFR) inhibitors. Molecular docking, synthesis and enzymatic evaluation of aminobenzoic and *p*-aminocinnamic acid derivatives.** 2022. 130f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Affecting 10 million human beings, and causing 1.6 million deaths per year, Tuberculosis is a global health problem. This can be related to the extensive treatment, with the high cost and numerous adverse events, that propitiates the emerging resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. This scenario thus stimulates the search for new, more effective, and less toxic drugs. Enzymes such as MtDHFR are essential for the replication of the *Mycobacterium tuberculosis* and show significant structural differences when compared to the human isoform becoming a target for the action of drugs. In this context, the search for 3-methylphenylamino benzoic acid analogues capable of inhibiting MtDHFR becomes of great interest. Thus, four series, a total of 64 new molecules, were designed through molecular modifications such as the introduction of bulky groups, retroisosterism, and chain extension to optimize the activity of 3-methylphenylamino benzoic acid and verify the efficiency of 4-aminocinnamic acid as a scaffold. The molecules were submitted to *in silico* studies of molecular docking with MtDHFR and it was verified that the proposed modifications resulted in an apparent improvement in the interaction with the catalytic site and a possible increase in selectivity profile. However, only one molecule was obtained with an overall yield of 5%, which was largely characterized by spectroscopic and purity techniques. The obtained compound will be evaluated in its acid and ester version for its inhibitory capacity against MtDHFR and hDHFR enzymes.

**Keywords:** Pharmaceutical and medicinal chemistry; Tuberculosis; Dihydrofolate reductase; MtDHFR; Molecular modifications; Bioisosterism

## Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, por sempre ter me apoiado, mesmo com todas as brigas e discussões, mas também pelos momentos alegres. Aos meus pais, pelo exemplo de determinação que sempre foram e sempre serão, principalmente nas adversidades.

Às minhas tias Solange (*in memoriam*) e Carmem (*in memoriam*), por sempre acreditarem em mim

A todos os meus amigos, da área ou não, que, mesmo sem entenderem, me apoiaram nesses momentos, dando forças e me fazendo relaxar para conseguir seguir em frente.

## **Agradecimentos**

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

Ao departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade em desenvolver este trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Parise Filho, que, mesmo após tanto tempo afastado da área, ofereceu-me a oportunidade e me aceitou, acreditando neste trabalho. Um exemplo como professor ético, competente e responsável que, ao aplicar seus puxões de orelha e fazer avaliações rigorosas, os fez sempre pensando no melhor e na minha evolução como profissional e cientista.

Aos meus pais que, mesmo não entendendo nada do que pesquiso, ainda estavam lá prontos para me apoiar e incentivar a não desistir. Em especial a minha mãe, que é um exemplo de mulher e de professora e que me mostrou que não há idade para evoluir, aprimorar-se e estudar ainda mais.

Aos meus colegas e amigos do LAPESSB: Nuno, Micael, Matheus, Thainá, Karol, Lara e principalmente a Karinne, pelos ensinamentos, discussões, auxílios e conversas sempre tão necessárias e muitas vezes sem nenhuma conexão com os assuntos do laboratório, mas tão importantes para o dia a dia.

A Valéria, por todo o apoio, ensinamento, companheirismo, palavras, almoços nos corredores e reuniões em dia de semana e nos finais de semana, conversas e discussões sobre assuntos diversos, sempre com bom humor. Embora dissesse que era sua obrigação, ainda assim meu obrigado.

Aos amigos do LAPEN: Luccas, Rodrigo, Erick e Filipe, pelos momentos de aprendizagem e diversão, fazendo o dia passar de uma maneira muito mais calma.



Às Prof<sup>as</sup>. Dr<sup>as</sup>. Jeanine Giarolla Vargas e Elizabeth Igne Ferreira, por todos os ensinamentos nas reuniões de grupo e também fora delas, em suas aulas sempre tão elucidativas.

Aos amigos do LITEC: Elys, Fernando, Carol, Evelin e Raissa, por todo o apoio, ensinamento e dificuldades divididas.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini, pelo apoio e por sempre estar disposto a ajudar e a orientar com relação aos estudos de modelagem molecular.

Aos funcionários: Monica, Charles, Maria Inês e todo o corpo técnico que sempre estiveram presentes e prestativos para ajudar, orientar, analisar e auxiliar no laboratório ou com conversas cheias de aprendizado.

Aos membros da minha banca de Qualificação Dr. Maurício Temotheo Tavares e Prof. Dr. Marcio Vinícius Bertacine Dias, pois, sem seus apontamentos, não teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus amigos pessoais (Vanessa, Isa, Fernanda, Carica, Julia, Marcelo, Thais, Ana, Shira, Marco, Shane, Elton, Djair, Rodrigo, Fabio, Ederson, Felipe, Junior, Thiago, Felipe, Felipy, Laura), que, mesmo sem entender e muitas vezes me achando maluco por estar nesta jornada, sempre me apoiaram e estiveram comigo seja física ou virtualmente, deixando esta trajetória muito mais leve. Sem vocês eu não teria chegado aonde cheguei.

E a todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente nesse caminho meu muito obrigado!

“Temos que continuar aprendendo. Temos que estar abertos.  
E temos que estar prontos para espalhar nosso conhecimento  
a fim de chegar a uma compreensão mais elevada da realidade.”

Thich Nhat Hanh

## LISTA DE ABREVIATÖES

Å	Angstrom
ACN	Acetonitrila
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
Ala	Alanina
Asp	ácido aspártico
ASP	<i>astex statistical potential</i>
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CC	cromatografia de coluna
CCD	cromatografia em camada delgada
CDCl <sub>3</sub>	clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
δ	deslocamento químico
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	duplo dupleto
DHFR	Di-idrofolato Redutase
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMF	dimetilformamida
DMSO-d <sub>6</sub>	dimetilsulfóxido deuterado
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOTS	<i>Directly Observed Treatment Strategy</i>
DprE1	decaprenilfosforil-β-D-ribose 20-epimerase
eq	Equivalente
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
h	Horas
H	Hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
hDHFR	di-idrofolato redutase humana
His	Histidina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	concentração inibitória de 50 %
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
Ile	Isoleucina
<i>J</i>	constante de acoplamento
LBDD	<i>ligand-based drug design</i>
LBVS	<i>ligand based virtual screening</i>
<i>m</i>	Meta
m	Multipeto
mg	Miligrama
MHz	mega Hertz
mL	Mililitro
MMFF	<i>Merck Molecular Force Field</i>
mmol	Milimol

MtDHFR	di-idrofolato redutase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTX	Metotrexato
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>p</i>	Para
<i>PDB</i>	<i>protein data bank</i>
Phe	Fenilalanina
PM6	<i>Parameterization Method 6</i>
ppm	partes por milhão
q	Quarteto
QcrB	deidroquinato sintase
QSAR	<i>quantitative structure activity relationship</i>
RMN	ressonância magnética nuclear
RMSD	<i>root-mean-square deviation</i>
s	Singleto
SBDD	<i>structure-based drug design</i>
Ser	Serina
sl	singleto largo
t	Tripleto
t.a.	temperatura ambiente
TB	Tuberculose
THF	Tetraidrofurano
TMP	Trimetoprima
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina
$\mu\text{M}$	Micromolar

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo patogênico do <i>M. tuberculosis</i> .	17
Figura 2: Estruturas químicas dos fármacos de primeira e segunda escolha para o tratamento da infecção por tuberculose.	19
Figura 3: Representação gráfica da transformação do ácido fólico em ácido <i>N,N</i> -metilenotetraidrofolico.	21
Figura 4: Representações gráficas da <i>Mt</i> DHFR, sítio catalítico e interação com o MTX.	23
Figura 5: Estruturas químicas dos inibidores de DHFR encontrados na literatura.	24
Figura 6: Protótipos contendo grupos farmacóforos não convencionais.	25
Figura 7: Estruturas dos análogos estudados por Kronenberger, 2020.	26
Figura 8: Planejamento racional de fármacos e as metodologias empregadas.	26
Figura 9: Planejamento dos compostos.	29
Figura 10: Interação dos ligantes <b>2h</b> (A), <b>1i</b> (B) e <b>1e</b> (C) com resíduos do sítio catalítico da <i>Mt</i> DHFR.	33
Figura 11: Interação dos ligantes <b>1h</b> (A), <b>1g</b> (B) e <b>2a</b> (C) com resíduos do sítio catalítico da <i>Mt</i> DHFR.	34
Figura 12: Interação dos ligantes <b>3x</b> (A), <b>4x</b> (B) e <b>4w</b> (C) com os resíduos do sítio catalítico da <i>Mt</i> DHFR.	35
Figura 13: Produtos sintetizados.	37
Figura 14: Espectro de RMN <sup>1</sup> H do Intermediário I da série 1 (CDCl <sub>3</sub> ).	39
Figura 15: Espectro de RMN <sup>13</sup> C do Intermediário I da série 1(CDCl <sub>3</sub> ).	39
Figura 16: Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>2h</b> (CDCl <sub>3</sub> ).	41
Figura 17: Espectro de RMN <sup>13</sup> C do éster <b>2h</b> (CDCl <sub>3</sub> ).	42
Figura 18: Espectro de RMN <sup>1</sup> H do éster <b>2a</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).	43
Figura 19: Espectro de RMN <sup>13</sup> C do éster <b>2a</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).	44
Figura 20: Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>2a</b> (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).	45
Figura 21: Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>2a</b> (CDCl <sub>3</sub> ).	45

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Rotas sintéticas utilizadas para formação dos compostos.	37
Esquema 2: Mecanismo simplificado de substituição nucleofílica tipo 2.	38
Esquema 3: Mecanismo simplificado de aminação redutiva	40
Esquema 4: Mecanismo simplificado de hidrólise alcalina	40
Esquema 5: Rota sintética do produto <b>2a</b>	42
Esquema 6: Rota sintética para obtenção dos compostos <b>31</b> e <b>33</b> .	48

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Dez melhores poses das moléculas (séries 1 e 2) ordenadas pela média do ranqueamento.	32
Tabela 2: Dez melhores poses das moléculas (séries 3 e 4) ordenadas pela média do ranqueamento.	34

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 TUBERCULOSE E CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	17
1.2. DI-IDROFOLATO REDUTASE DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MtDHFR) E A VIA DO FOLATO.....	21
1.3. INIBIDORES DE MtDHFR .....	23
1.4 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS.....	26
<b>2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3. PLANEJAMENTO DOS COMPOSTOS</b> .....	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
4.1. ESTUDOS COMPUTACIONAIS (in silico) .....	30
4.1.1. Reancoramento no sítio catalítico da MtDHFR .....	30
4.1.2. Resultados do ancoramento dos compostos propostos .....	31
4.2. SÍNTESE DOS COMPOSTOS.....	36
4.2.1. Síntese dos compostos das séries 1 e 2 .....	37
4.2.1.1. Síntese dos intermediários ésteres 31 e 33 .....	38
4.3.2. Síntese dos produtos finais das séries 1 e 2 .....	40
4.3.2.1. Síntese do intermediário éster 2a.....	42
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	46
<b>6. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	47
6.1. MÉTODOS COMPUTACIONAIS (in silico) .....	47
6.2. MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES.....	48
6.3. MÉTODOS SINTÉTICOS .....	48
6.3.1. Síntese dos compostos 31 e 33.....	48
6.3.2. Síntese dos produtos finais das séries 1 e 2 .....	49
6.3.2.1. Síntese do produto 2a.....	50
6.4. MÉTODOS ANALÍTICOS E DE CARACTERIZAÇÃO .....	51
6.4.1. Cromatografia em camada delgada .....	52
6.4.2. Cromatografia em coluna.....	52
6.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência .....	52
6.4.4. Ressonância magnética nuclear .....	52
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54
<b>Anexos</b> .....	61



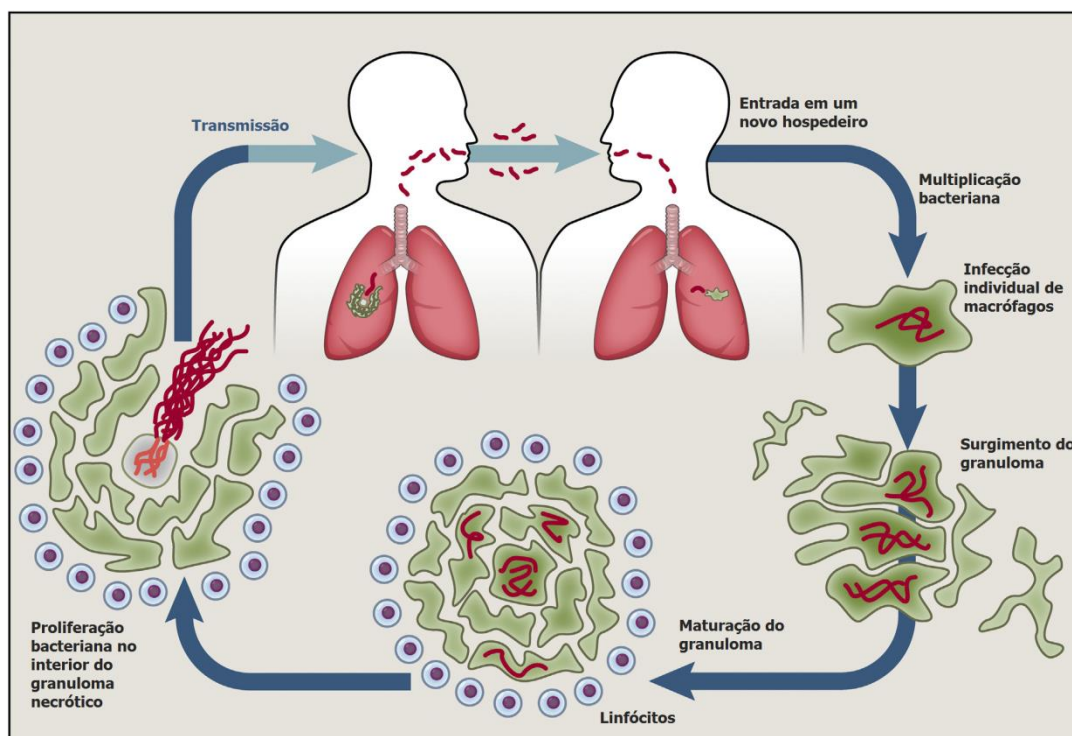
ANEXO I: TABELAS .....	61
ANEXO II: ESPECTROS DE RMN .....	64
ANEXO III: CROMATOGRAMAS DE PUREZA .....	69
ANEXO IV: CURRÍCULO LATTES .....	71

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 TUBERCULOSE E CONSIDERAÇÕES GERAIS

A tuberculose (TB) é uma doença contagiosa que tem como agente etiológico a micobactéria do gênero *Mycobacterium*, constituído por seis espécies estritamente patógenas ao homem (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. mageritense* e *M. tuberculosis*). Isolada em 1882 por Robert Koch, a *M. tuberculosis* passou a ser conhecida como bacilo de Koch (WHO, 2018; Barbassa, 2010). É caracterizada pelo quadro clínico de uma inflamação crônica granulomatosa no parênquima pulmonar e nos linfonodos hilares, conhecida assim como tuberculose pulmonar, mas podendo atingir outros órgãos e, desta forma, chamada de extrapulmonar (WHO, 2021; Primi, 2018; Quaglio *et al.*, 2018; Patil *et al.*, 2018).

A transmissão da micobactéria ocorre por via aérea quando o indivíduo infectado expulsa gotículas contendo o bacilo viável. O bacilo expelido é então inalado pelo indivíduo não infectado e fagocitado por macrófagos dos alvéolos pulmonares. As replicações dos macrófagos infectados formam o granuloma característico da doença (Figura 1). O desenvolvimento da TB dependerá de fatores como a idade e imunidade do paciente, e período de latência da infecção (Fogel, 2015).



**Figura 1:** Ciclo patogênico do *M. tuberculosis* (Adaptado de Cambier, Falkow e Ramakrishnan, 2014).

Este período de latência, comum em 90% dos casos de infecção, é caracterizado pela ausência de manifestações clínicas, pois a resposta imune do indivíduo prossegue em constante estímulo de anticorpos contra a micobactéria. Nos outros 10% dos casos, as manifestações clínicas são observadas e a progressão da doença é significativa, caracterizando então sua forma ativa (Chang *et al.*, 2018).

De acordo com o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2021 sobre a TB, a cada ano, em média, 10 milhões de pessoas são afetadas pela doença. Deste número, cerca de mais da metade (em torno de 58%) são homens adultos, enquanto o restante pode ser dividido entre mulheres (32%) e crianças (10%). Em 1993, a OMS definiu a TB como problema de saúde pública mundial e, desde 1997, é considerada a causa líder de mortes por um único agente infeccioso, sobrepondo inclusive a AIDS (do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) (WHO, 2021; Eshetie *et al.*, 2018; Palucci & Delogu, 2018).

Dados recentes coletados pela OMS estimam 1,3 milhão de mortes em decorrência da TB entre pacientes não portadores do vírus HIV (do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) e 300 mil mortes entre os pacientes portadores do vírus HIV (WHO, 2021). A incidência de casos de TB em pacientes portadores da AIDS pode ser justificada pela depleção de células T CD4<sup>+</sup>, causada por infecção pelo vírus HIV, o que leva o indivíduo à redução de sua defesa e conseqüentemente aumenta a vulnerabilidade a infecções oportunistas (Corleis *et al.*, 2019).

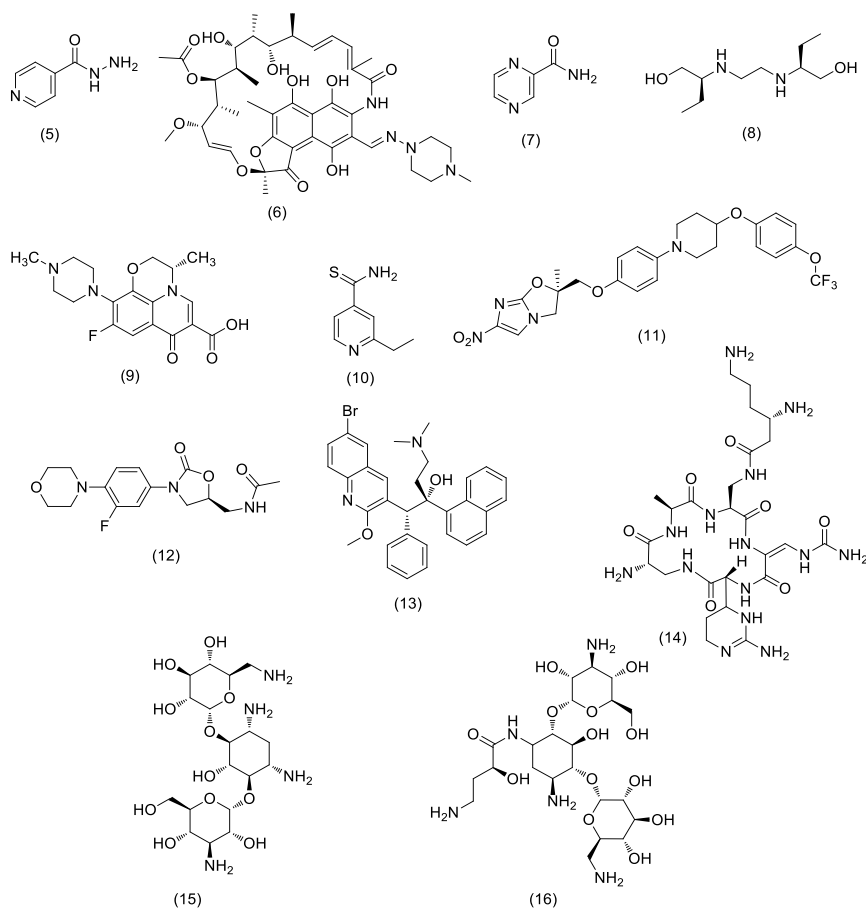
A mortalidade por TB está entre 50 e 80% dos pacientes quando não tratados. Entretanto, quando a TB é tratada, a mortalidade pode ser reduzida para 5% dos pacientes, desde que a terapia seja acompanhada e constante. Caso a farmacoterapia não seja acompanhada, a mortalidade poderá ser de aproximadamente 30% (Krstiski *et al.*, Ismail *et al.*, 2018; Primi, 2018; Quaglio *et al.*, 2018).

Isto posto, a OMS inicia em 2006 um plano focado no fortalecimento de sistemas de saúde. Desta forma adota-se uma estratégia de terapia diretamente observada (DOTS - do inglês, *Directly Observed Treatment Strategy*) prevendo uma queda em torno de 8% na incidência de novos casos. Contudo, com a implementação da DOTS, observou-se nos anos seguintes queda de apenas 1,5% na incidência anual de casos entre os países que adotaram o procedimento. No Brasil, a aplicação do DOTS apresentou resultado de 2%, mas ainda aquém do esperado (WHO, 2021; Kritski *et al.*, 2018).

Em 2015, seis países contribuíam com mais de 60% dos novos casos de TB no mundo, eram eles: Índia, Indonésia, China, Paquistão, Nigéria e África do Sul (Eshetie *et al.*, 2018; Adigun & Singh, 2022). Reforça-se que indivíduos HIV-positivos, países em desenvolvimento, crises populacionais (guerras civis) ou recursos limitados ainda figuram

como principais fatores de risco para o desenvolvimento e prevaência da TB. Isto ocorre mesmo com a implementação das farmacoterapias de primeira e segunda escolha (WHO, 2021; Kristski *et al.*, Ismail *et al.*, 2018; Palucci & Delogu, 2018; Patil *et al.*, 2018). Dados mais recentes sobre a TB apresentam uma queda na notificação de novos casos, isso se deve ao realocamento de recursos financeiros e humanos para o esforço contra a pandemia do COVID-19 (Teo *et al.*, 2021).

A farmacoterapia de primeira escolha para o tratamento da TB preconiza o uso de isoniazida (5), rifampicina (6), pirazinamida (7) e etambutol (8) combinados (Figura 2), por um período que pode variar de seis meses a um ano. Esse intervalo demasiadamente longo, somado à percepção inicial de melhoria no início do tratamento, leva uma parcela dos pacientes a abandonarem o tratamento e, por consequência, à demora na cura, quando esta ocorre. Esta interrupção favorece a seleção de cepas resistentes, como resultado cerca de meio milhão de indivíduos por ano acabam por apresentar cepas resistentes aos tratamentos convencionais. Neste caso, recomenda-se a substituição do tratamento de primeira escolha por fármacos de segunda escolha, como levofloxacino (9), etionamida (10), linezolida (11), bedaquilina (12), delamanida (13), capreomicina (14), canamicina (15) e amicacina (16), por um período de até 20 meses (Figura 2) (Bansalet *et al.*, 2018).



**Figura 2:** Estruturas químicas dos fármacos de primeira e segunda escolha para o tratamento da tuberculose.

Esta estratégia traz consigo também diversos efeitos adversos debilitantes ao organismo, um período ainda prolongado de terapia e custos financeiros elevados. Esses pontos dificultam ainda mais a adesão dos pacientes e favorece a adaptação do *Mycobacterium* à nova terapia, originando cepas resistentes também aos fármacos de segunda escolha (Karoli *et al.*, 2018; Lamichhane, 2011; Singh *et al.*, 2019; Vasava *et al.*, 2017).

As terapias combinadas com os programas de vacinação em massa da população com a BCG seriam o suficiente para a eliminação da doença e, com isso, as indústrias farmacêuticas e outros patrocinadores passaram a demonstrar baixo, ou inexistente, interesse pelo desenvolvimento de novos fármacos anti-TB. A TB então passa a ser considerada uma doença negligenciada por estar associada a países menos desenvolvidos, onde as condições de higiene e saneamento básico são precárias, bem como a alimentação e acesso aos serviços de saúde, além do acesso dificultado ao tratamento adequado (Dartois, Barry, 2013; Duncan, 2003; Silva *et al.*, 2017; Prasad, 2010; Adigun & Singh, 2022).

Em 2020, a pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2 afetou diretamente os programas de prevenção e tratamento estabelecidos para a TB, uma vez que esforços médicos, equipamentos e financiamentos foram redirecionados para o combate deste novo quadro mundial. A TB e o COVID-19 dividem similaridades como a transmissão por via aérea e o comprometimento dos pulmões favorecendo quadros de co-infecção. Soma-se a isso o isolamento obrigatório, com conseqüente aumento da pobreza, e o confinamento em espaços com pessoas doentes favorecendo uma vulnerabilidade à TB (McQuaid *et al.*, 2021; Teo *et al.*, 2021).

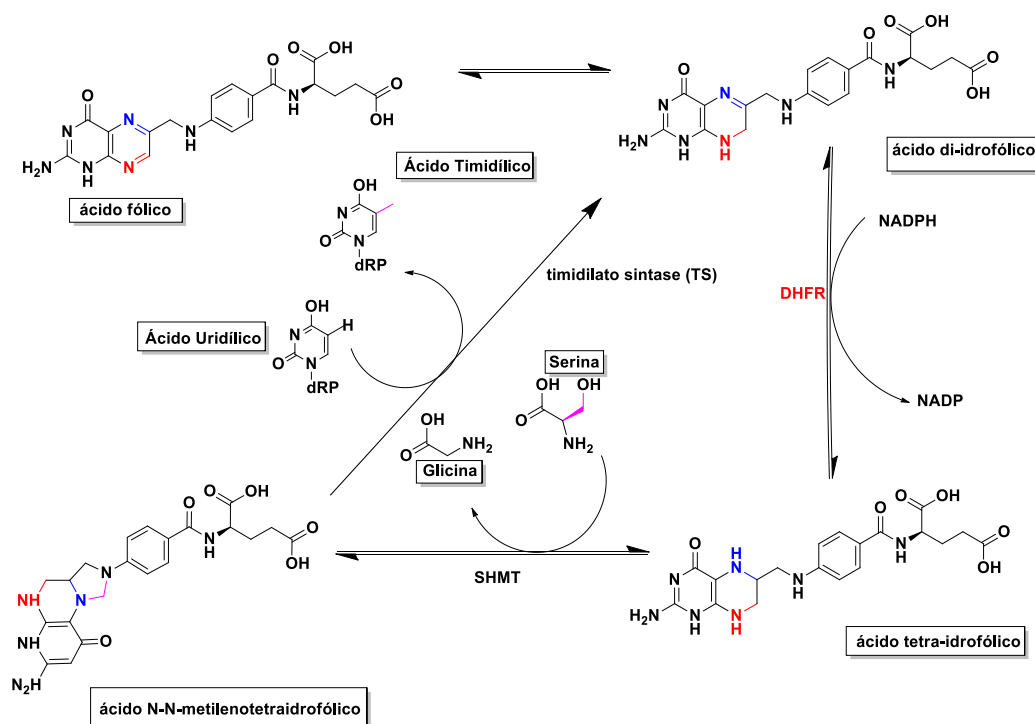
O isolamento e falta de acesso aos sistemas de saúde (virtuais ou não) para acompanhamento refletiu em uma queda de 20% na detecção de novos casos de TB. Entretanto, estes dados podem significar futuramente um aumento entre 8-20% de óbitos. A falta de dados repercute em uma dificuldade de determinar de forma real a queda nos casos de TB e surgimento de cepas resistentes ou extremamente resistentes, sendo necessário o desenvolvimento de novos fármacos (Kozinska *et al.*, 2021).

Para o desenvolvimento de novos fármacos, pode-se partir de fármacos existentes criando-se análogos e derivados ou criar moléculas inovadoras a partir da caracterização de novos alvos identificados na sequência genômica do *M. tuberculosis* (Satta *et al.*, 2017). Dentre os alvos atualmente explorados estão a enzima enoil-ACP redutase (InhA), responsável pela biossíntese de ácidos graxos; a proteína de transporte transmembrana MmpL3, que permite a passagem de substâncias variadas para o interior da micobactéria;

a enzima decaprenilfosforil- $\beta$ -D-ribose 20-epimerase (DprE1), envolvida com a formação da parede celular; a enzima deidroquinato sintase (QcrB), relacionada com a inibição da subunidade b do citocromo bc1, e a enzima Di-idrofolato redutase (DHFR), fundamental para o metabolismo do folato e formação de material genético (Lele *et al.*, 2015;. Campaniço *et al.*, 2018).

## 1.2. DI-IDROFOLATO REDUTASE DE *Mycobacterium tuberculosis* (MtDHFR) E A VIA DO FOLATO

A DHFR encontra-se presente em microrganismos e em mamíferos, apresentando diferenças em sua constituição. Ela atua na via do ácido fólico (Figura 3), essencial na síntese do DNA e replicação celular. O ácido fólico, componente central desta via, tem papel como doador de carbono para a biossíntese de purinas e pirimidinas envolvidas na formação dos ácidos nucleicos (Lele *et al.*, 2015). A transformação do ácido di-idrofolico em ácido tetraidrofolico ocorre por ação da DHFR tornando-se uma etapa chave na formação da timidina que será utilizada para síntese de DNA. Caso exista a inibição da enzima, o fornecimento de timidina no ciclo da síntese não ocorrerá, ocasionando então a parada do ciclo celular ou inibição da sua replicação (Lele *et al.*, 2015; Lele *et al.*, 2016).



**Figura 3:** Representação gráfica da transformação do ácido fólico em ácido *N-N*-metilenotetraidrofolico.

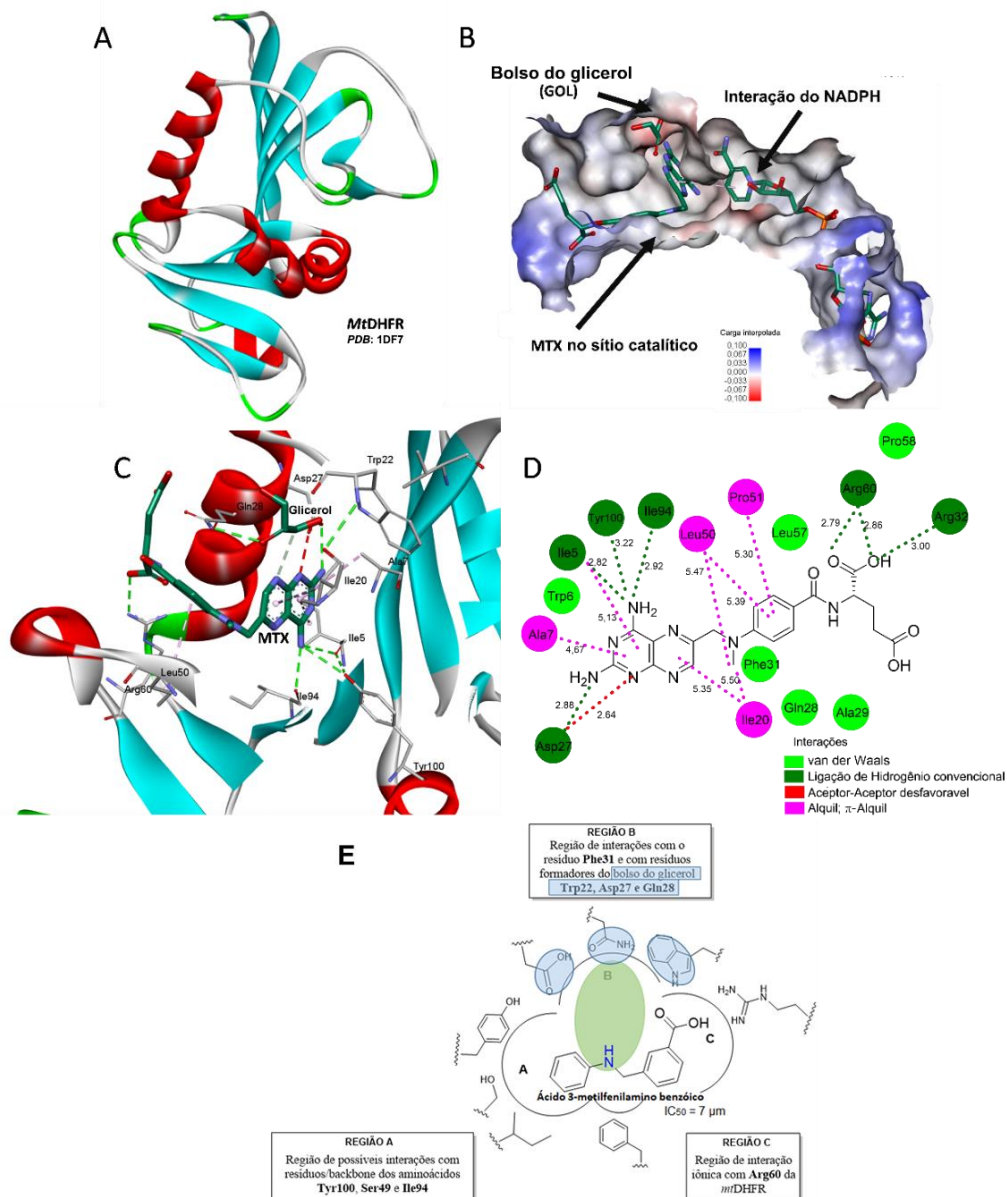
A DHFR é formada por uma folha beta central de sete fitas cercada por quatro hélices alfa (Li *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2015; Riyadh *et al.*, 2018; Tawari *et al.*, 2011) e uma única

fita C-terminal antiparalela. A DHFR presente em *Mycobacterium* (*MtDHFR*) e a humana (*hDHFR*) apresentam 26% de similaridade, diferenciando-se principalmente em seus sítios catalíticos (Sharma *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2000). Comparando a estrutura da *MtDHFR* com a *hDHFR*, Li e colaboradores observaram que a primeira possui 159 resíduos de aminoácidos enquanto a *hDHFR* apresenta 187 resíduos, e que a principal diferença está no lado *N*-terminal das folhas beta, e não no lado *C*-terminal da folha onde ocorre a ação da enzima (Li *et al.*, 2000).

Em 2000, Li *et al.*, identificou os principais resíduos de aminoácidos presentes nos sítios catalíticos das enzimas. O sítio da *MtDHFR* tem o formato de “L” e é constituído pelos resíduos Phe31, Asp27, Gln28, Ile94, Ile5, Tyr100, Ala7, Trp6, His30, Gly95 e Ser49 (Figura 4A). Para que a enzima *MtDHFR* realize sua ação catalítica, devem ocorrer ligações de hidrogênio com os resíduos Asp27, Arg32 e Ser49 e uma ligação do tipo hidrofóbica com o resíduo Phe31, conforme observado na Figura 4D, diferenciando da isoforma humana, onde as ligações de hidrogênio devem ocorrer com os resíduos Val115 e Gln35, e a ligação do tipo empilhamento  $\pi$  com o resíduo Phe34.

Ademais, a enzima *MtDHFR* apresenta um bolso adjacente constituído por Trp22, Asp27 e Gln28. Esse bolso é complementar ao sítio catalítico da enzima e inexistente na isoforma humana (Figura 4C). A ele, liga-se uma molécula de glicerol (GOL), um artefato de cristalização utilizado para a proteção da enzima durante o procedimento (Figura 4B) (Li *et al.*, 2000; Souza, 2018; Sharma *et al.*, 2018). Ambas as enzimas se diferem em relação ao sítio de ligação do NADPH, o qual apresenta características mais hidrofóbicas na *MtDHFR*, enquanto na isoforma humana, apresenta características hidrofílicas (Li *et al.*, 2000; Souza, 2018; Vassiliades *et al.*, 2022).

Sendo assim, as diferenças nos resíduos de aminoácidos essenciais para a ação do sítio catalítico e o acesso ao bolsão com afinidade pelo GOL poderão servir como base para estratégias interessantes na obtenção de prováveis inibidores seletivos de *MtDHFR* (Figura 4E).



**Figura 4:** Representações gráficas da *MtDHFR*, sítio catalítico e interação com o MTX: A) Estrutura da *MtDHFR* (PDB: 1DF7). B) Sítio catalítico da *MtDHFR* enfatizando a porção pteridínica do MTX e a visualização do GOL e do sítio do NADPH. C) Interações entre resíduos do sítio ativo da *MtDHFR* (representação em *cartoon*) com o MTX e GOL. D) Representação 2D das interações entre *MtDHFR* e MTX. Distâncias em verde indicam ligações de hidrogênio. Distâncias em rosa claro indicam interações hidrofóbicas. Imagens obtidas com o programa Discovery Studio, Biovia. E) Representação 2D de resíduos de interesse presentes no sítio catalítico e acessório da DHFR com possível exploração a partir do composto **30**.

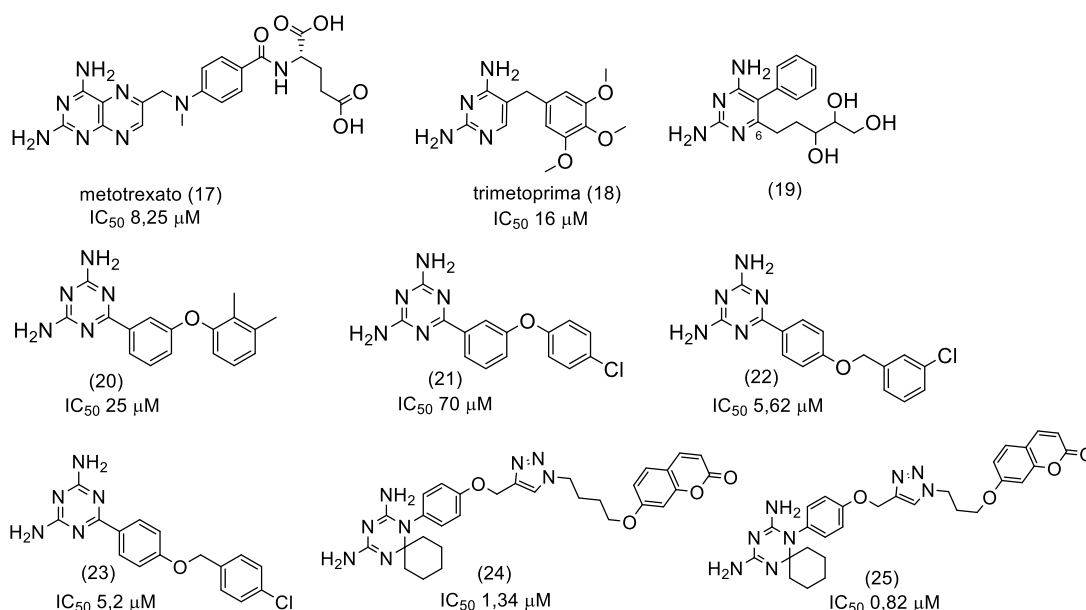
### 1.3. INIBIDORES DE *MtDHFR*

Os primeiros inibidores de DHFR (DHFRi) utilizados na terapêutica foram o metotrexato (MTX) (**17**) e a trimetoprima (TMP) (**18**) (Figura 5). O MTX é considerado um anti-metabólito da *hDHFR* voltado para o tratamento de neoplasias, enquanto a TMP é utilizada para o combate a infecções bacterianas, todavia não apresentam seletividade para a isoforma humana e desta forma têm ação sobre a *MtDHFR* e a *hDHFR*, passando a ser referência para o desenvolvimento de análogos otimizados. Com base nos estudos das



estruturas tridimensionais das *h*DHFR e *Mt*DHFR, diversas moléculas têm sido propostas, apresentando em sua estrutura grupos semelhantes ao MTX e à TMP (Li *et al.*, 2000; El-Hamamsy *et al.*, 2007; Tawari *et al.*, 2015; Lele *et al.*, 2015; Lele *et al.*, 2016), conforme apresentado na Figura 5.

Dentre estas moléculas existem estruturas com anel 2,4-diaminopirimidina ligado a anéis aromáticos (**19**) (El-Hamamsy *et al.*, 2007), e com anel diaminotriazínico ligados a grupos fenoxifenil (**20** e **21**) (Lele *et al.*, 2015 e Lele *et al.*, 2016). Estes compostos apresentaram melhor seletividade pelo sítio catalítico da *Mt*DHFR por realizar interações com o resíduo Arg27 pertencente ao bolso acessório que acomoda a molécula de GOL. Adicionalmente, em **20** e **21**, o anel aromático central realiza interações do tipo empilhamento  $\pi$  com o resíduo Phe31, e a porção diamino estabelece ligações de hidrogênio com os resíduos Ile5 e Ile94. Contudo a eficácia do composto **19** foi avaliada apenas qualitativamente (El-Hamamsy *et al.*, 2007; Lele *et al.*, 2015; Lele *et al.*, 2016).



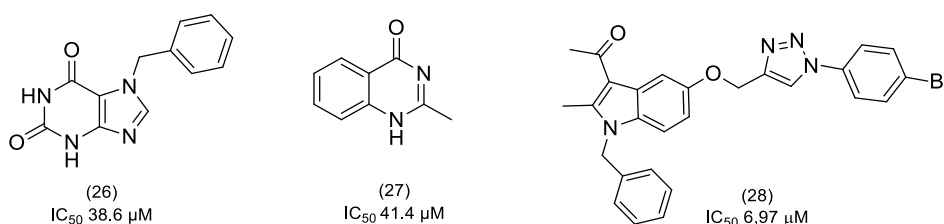
**Figura 5:** Estruturas químicas e valores de IC<sub>50</sub> de alguns inibidores de DHFR encontrados na literatura.

As moléculas sintetizadas por Lele *et al.* (2015) (**20** e **21**) foram avaliadas quanto à inibição enzimática frente a *Mt*DHFR e a *h*DHFR em comparação ao MTX. Os inibidores obtiveram seletividade maior que o MTX, porém se revelaram menos potentes. A inclusão de cloro-benzila como substituinte em derivados triazínicos de pirimidinas (**22** e **23**) proposta por Tawari *et al.* (2015) levou à formação de compostos seletivos para a *Mt*DHFR, e com baixa toxicidade em humanos. Estas moléculas são estruturalmente semelhantes ao trabalho de Lele *et al.* (2015) e apresentaram valores de IC<sub>50</sub> entre 5,20 e 5,62  $\mu$ M frente à *Mt*DHFR. Os estudos computacionais realizados demonstraram que o grupo clorobenzil interage com

os aminoácidos Pro52, Leu50, Leu5 e Phe31 do sítio catalítico da enzima, justificando a elaboração de moléculas com substituintes nesse anel.

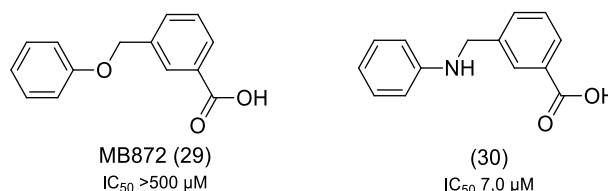
Derivados do 1,3,5-triazaspiro[5.5]undeca-2,4-dieno (**24** e **25**) com atividade frente à *Mt*DHFR foram utilizados como protótipos para a obtenção de novos inibidores. A associação com resíduos de aminoácidos forneceu compostos com IC<sub>50</sub> de 0,82 e 1,34 µM para *Mt*DHFR e entre 11,99 e 15,32 µM para a *h*DHFR. Estes compostos mais efetivos obtiveram uma MIC<sub>50</sub> de 0,01µM (Yang *et al.*, 2017).

Vassiliades *et al.* (2022) relata a utilização de grupos farmacóforos não convencionais como esqueleto para novos protótipos. Dentre estes grupos encontram-se xantinas (**26**), 4-quinazolinonas (**27**) e indóis (**28**) (Figura 6), apresentando interações com resíduos específicos do sítio catalítico da *Mt*DHFR, como Asp27 (**26**) e Phe31 (**27** e **28**). Entretanto, os valores obtidos de IC<sub>50</sub> mostraram-se superiores quando comparados aos protótipos contendo os anéis diaminopiridinas e diaminotiazínicos. Estudos de *docking* realizados particularmente com a molécula **28** revelaram que a presença da metila no anel benzilindol é importante para a interação com o sítio acessório do GOL, sugerindo uma maior seletividade para a *Mt*DHFR (Vassiliades *et al.*, 2022).



**Figura 6:** Moléculas contendo grupos farmacóforos não convencionais.

Recentemente, a equipe do Laboratório de Planejamento e Síntese de Substâncias Bioativas (LAPESSB) da FCF da USP, baseando-se no protótipo MB872(**29**) (Figura 7) e dados estruturais da *Mt*DHFR complexada, cedidos pelo professor Dr. Marcio Dias do ICB da USP, sintetizou 22 análogos, variando posições e grupos substituintes. Verificou-se que modificações, como bioisosterismo, ocasionaram melhoria importante nos valores de atividade inibitória sobre a *Mt*DHFR. A partir de ensaios enzimáticos, confirmou-se a efetividade dos compostos sintetizados, dentre os quais o mais ativo (**30**) (Figura 7) apresentou um valor de IC<sub>50</sub> de 7 µM (Kronenberger *et al.*, 2020).



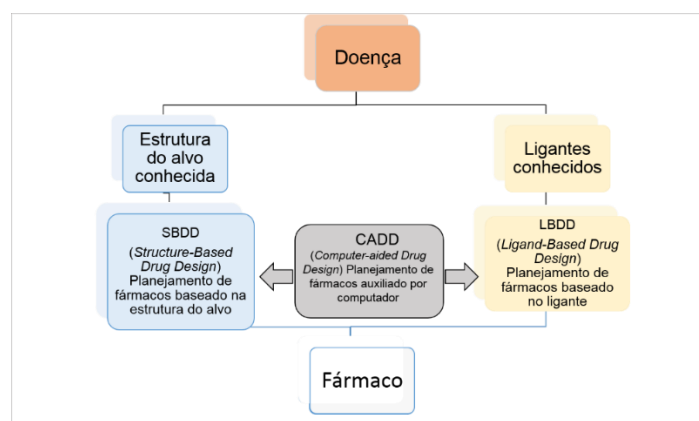
**Figura 7:** Estrutura do protótipo MB872 e seu análogo bioisostérico (Kronenberger *et al.*, 2020).

Estudos preliminares de *docking* molecular do composto **30** sobre a *MtDHFR* demonstraram que o grupo amina, embora não faça ligações específicas com o sítio catalítico, posiciona-se próximo ao bolso acessório do GOL, o que sugere a possibilidade de exploração com a inclusão de grupos volumosos no nitrogênio. Ensaios de dinâmica molecular sugerem, ainda, que **30** também interage com os resíduos Gln28, Ile20 e Ile94 do sítio catalítico da *MtDHFR*. Esses ensaios simularam a interação da enzima com o substrato, apresentando a conformação fechada da proteína, na qual o composto **30** parece ter preferência por se ligar em um sítio único da enzima, formado pelos resíduos Arg32, Arg60 e ocasionalmente Phe31, realizando assim um mecanismo de inibição não competitivo na conformação fechada da *MtDHFR*. No ensaio de inibição enzimática realizado com o bioisóstero **30**, quando comparado à TMP, apresentou atividade duas vezes superior (Kronenberger *et al.*, 2020).

Isto posto, o análogo obtido mostra-se interessante molécula para otimização e estudo de eficácia no alvo escolhido.

#### 1.4 PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

A busca por fármacos mais eficazes é demanda constante na terapêutica. Para a pesquisa e criação de novos fármacos seletivos, com menor toxicidade e melhor perfil farmacocinético e farmacodinâmico, aplica-se atualmente o planejamento racional de fármacos: combinação de química medicinal com técnicas computacionais (Figura 8) (Guido *et al.*, 2010; Chen Lo *et al.*, 2016).



**Figura 8:** Planejamento racional de fármacos e as metodologias empregadas.

O planejamento racional de fármacos pode se basear em duas abordagens. A primeira, denominada Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura (SBDD, do inglês *Structure-Based Drug Design*), dá-se a partir do conhecimento da estrutura tridimensional do alvo relacionado à fisiopatologia da doença. Nesta abordagem, compreende-se as bases moleculares da doença e o arranjo topológico do alvo, possibilitando a elaboração de ligantes com perfis farmacológicos mais bem estabelecidos (Guido *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2015).

Pode-se então aplicar a estratégia conhecida como ancoragem molecular ou, do inglês, *docking* molecular. Na ancoragem, há a predição por meio virtual das conformações bioativas dos possíveis ligantes no alvo proteico com seguinte avaliação e classificação da interação (Guido *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2015).

A segunda abordagem consiste no Planejamento de Fármacos Baseado no Ligante (LBDD, do inglês *Ligand-Based Drug Design*) e se utiliza do conhecimento sobre os ligantes com atividade previamente conhecida contra a patologia. Para auxiliar essa abordagem, pode-se utilizar diversos métodos qualitativos, dentre eles está a triagem virtual baseada no ligante (LBVS, do inglês *Ligand Based Virtual Screening*). A partir de bancos de dados, características comuns (grupos, interações, formatos, flexibilidade, dados de ancoramento) entre compostos ativos de interesse são identificadas e utilizadas como filtro para a seleção, ou orientação para a síntese de novas moléculas. Essa seleção otimiza etapas laboratoriais, estudos *in vitro*, eliminando características indesejáveis e prevendo características ADMET (do inglês, *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity*) (Lionta *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2015; Guido *et al.*, 2010; Piccirillo & Amaral, 2018; Acharya *et al.*, 2011).

Tanto SBDD quanto LBDD possuem uma série de técnicas que podem, ou não, ser utilizadas em conjunto para o planejamento racional. Contudo, a mescla das duas abordagens acaba por originar moléculas ainda mais específicas. O uso integrado ocasiona, dessa forma, um sinergismo e uma complementariedade, permitindo diminuição de custos e de tempo no processo de pesquisa e desenvolvimento de moléculas (Lionta *et al.*, 2014; Anderson, 2003; Guido *et al.*, 2010).

## 2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

A tuberculose é uma doença de relevante incidência e mortalidade e enfrenta diversos agravantes que incluem a comorbidade com a AIDS e com o Covid-19, além da baixa adesão e resistência da micobactéria frente à terapia existente. Isto a caracteriza

como um problema de saúde pública mundial e traz a urgente necessidade de se desenvolverem novos fármacos para o tratamento da doença (Furin *et al.*, 2019; Adigun & Singh, 2022).

Tendo isto em vista, utilizando dos estudos de interação de protótipos obtidos pelo nosso grupo de pesquisa com o sítio catalítico da enzima, este projeto tem como objetivo geral desenvolver novos inibidores de *MtDHFR* com potencial atividade frente ao *M. tuberculosis*. Neste contexto, este projeto tem como objetivos específicos:

I – Propor inibidores baseados no composto **30** e na estrutura do ácido *p*-aminodihidrocinâmico, planejados por estratégias de adição de grupos volumosos, retroisosterismo e extensão de cadeia e realizar estudos de *docking* molecular, com o intuito de direcionar as etapas sintéticas;

II - Sintetizar e caracterizar os compostos planejados;

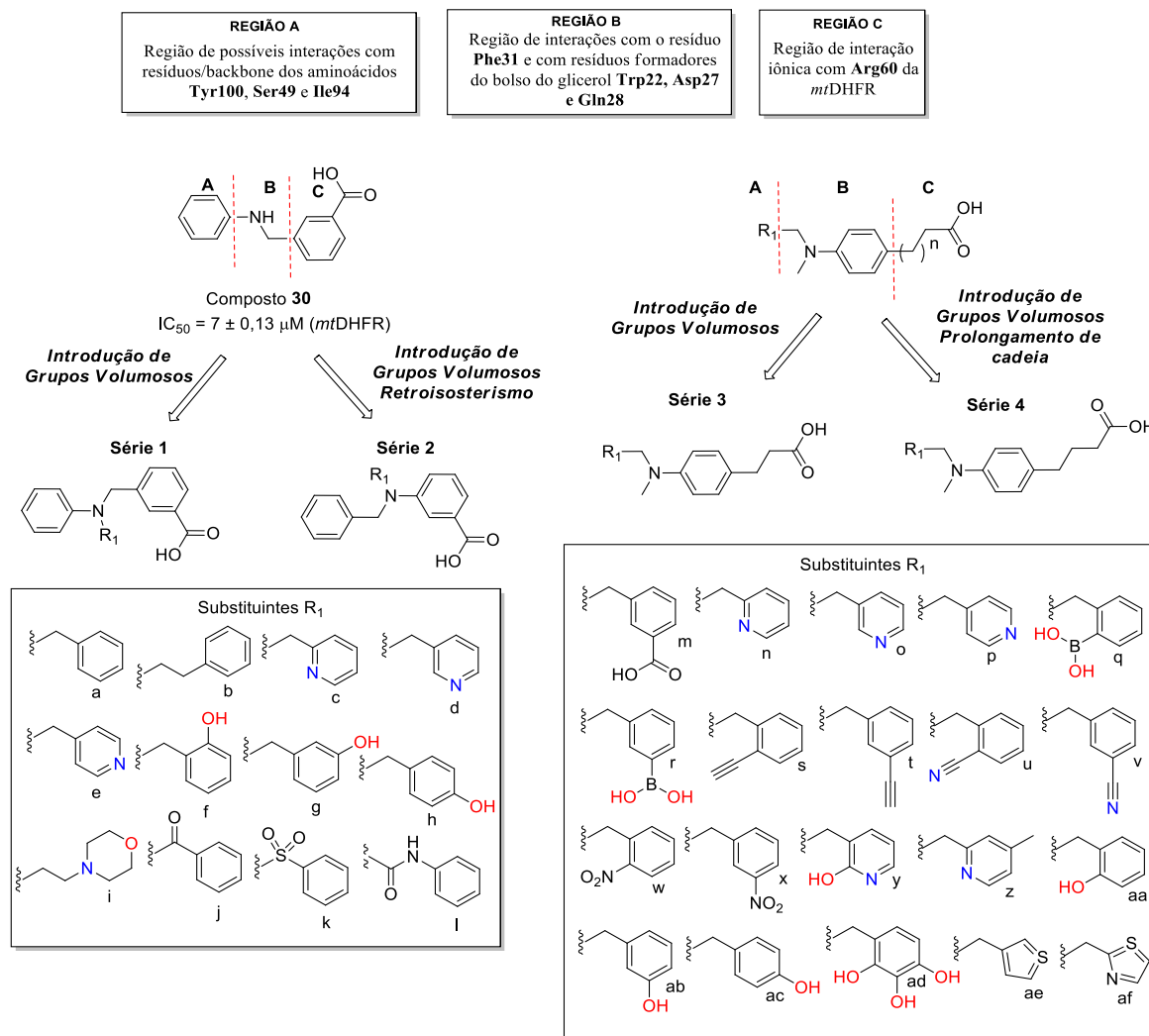
III– Avaliar a atividade inibitória das moléculas sintetizadas frente à *MtDHFR*;

IV – Avaliar a atividade antimicobacteriana dos compostos com melhor resposta no ensaio de inibição enzimática.

### 3. PLANEJAMENTO DOS COMPOSTOS

Com base nas informações disponíveis sobre as interações entre ligantes e *MtDHFR*, estratégias de modificações moleculares foram aplicadas ao composto **30**, a fim de otimizar sua interação com o sítio catalítico da enzima. Isso originou duas séries de moléculas (1 e 2) (Figura 9). A ambas foi proposta a adição de grupos volumosos e à série 2, retroisosterismo. Os dados previamente obtidos também revelam que o grupo carboxílico presente no composto **30** parece não interagir eficientemente com os resíduos Arg60 e Arg32, importantes para a interação com o sítio ativo. Isto posto, outras duas séries (3 e 4) foram propostas, possuindo a extensão da cadeia alifática e a inclusão de grupos volumosos, trazendo similaridades com o composto **30** e o ácido *p*-aminodihidrocinâmico (Figura 9) (Kronenberger *et al.*, 2020).

Tendo em vista que o composto interage com resíduos distintos do sítio catalítico da enzima, os compostos foram divididos em 3 regiões para a realização das modificações (Figura 9). As séries 1 e 2, baseando-se no composto **30**, diferenciam-se pela posição do heteroátomo na região **B**, no qual ocorrerão as substituições no grupo amino com a introdução de grupos volumosos. As regiões **A** e **C** foram mantidas inalteradas, pois estudos prévios de nosso grupo mostraram que são porções importantes para interações com resíduos de Tyr100, Ser49 e Ile94, bem como interação iônica com o resíduo da Arg60.



**Figura 9:** Planejamento dos compostos.

A série 1 foi proposta pela introdução de grupos volumosos, lipofílicos ou com a presença de grupos aceptores/doadores de ligações de hidrogênio. Estudos anteriores demonstram que a região pode interagir com resíduo de Phe31. Espera-se que estes análogos possam atingir o bolsão acessório formado pelos resíduos de Trp22, Asp27 e Gln28 e melhorar a seletividade para *MtDHFR*. A introdução de grupos aceptores/doadores de ligação de hidrogênio foi idealizada na possibilidade de aumentar pontos de interação com resíduos de aminoácidos ou com o próprio *backbone* da enzima. Esses grupos possuem características eletrônicas distintas, o que nos gera possibilidades diversas para verificar o melhor grupo para a afinidade.

A série 2 foi baseada em retroisosterismo na região **B** do inibidor **30** com o intuito de verificar se as interações com os aminoácidos do sítio catalítico podem ser modificadas ou moduladas. Desta forma verificou-se se a posição do grupo amino favorece também a interação com o resíduo de Phe31. Os grupos volumosos propostos para a série 1 serão

também utilizados nesta série, assim espera-se que o bolsão acessório formado pelos resíduos Trp22, Asp27 e Gln28 também seja acessado, melhorando a seletividade para *MtDHFR*.

As séries 3 e 4 foram propostas alterando a distância entre as regiões **B** e **C** com o objetivo de verificar se há uma melhor interação com o resíduo Arg60 localizado na parte mais externa do sítio catalítico da *MtDHFR*. O prolongamento da cadeia carbônica pode aumentar a flexibilidade e, ademais, modular o ajuste do inibidor ao sítio ativo, mimetizando a conformação dos inibidores clássicos MTX e TMP e ocupando melhor o sítio ativo da enzima. As substituições na região **A** com anéis aromáticos, heterocíclicos e com substituintes aceptores/doadores de ligação de hidrogênio têm como objetivo modular e promover interações com os demais resíduos do sítio catalítico ou pertencentes ao *backbone* da enzima.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ESTUDOS COMPUTACIONAIS (*in silico*)

Os estudos *in silico* baseiam-se em técnicas de modelagem molecular. Estas técnicas visam prever os comportamentos de moléculas em condições sistêmicas e, desta forma, guiar o planejamento e síntese de compostos. O ancoramento molecular, embora não seja um dos estudos mais aprofundados, é um método robusto que permite o estudo do comportamento de moléculas pequenas nos sítios de ação de proteínas no nível atômico. Por fornecer essas informações, torna-se válido e importante a sua realização antes da síntese dos compostos planejados (De Ruyck *et al.*, 2016; Acharya *et al.*, 2019; Meng *et al.*, 2011).

#### 4.1.1. Reancoramento no sítio catalítico da *MtDHFR*

Para a realização dos estudos *in silico* é necessário que o método escolhido para a modelagem seja validado antes de sua utilização, garantindo que os resultados obtidos com os compostos obtenham precisão, robustez e sejam confiáveis (Giudice, 2016).

O método escolhido para a validação foi o de *redocking* com os ligantes co-cristalizados presentes na *MtDHFR*, visando garantir um posicionamento correto dos futuros candidatos a inibidores e a capacidade preditiva do método. O método que apresentou o melhor valor de RMSD (*root-mean-square deviation*) (0,53 Å) utilizou a função “GOLDScore” com o MTX como referência e um raio de 10 Å. O NADPH foi mantido

inalterado na proteína, pois a presença da função nicotinamida parece ser importante para a interação com os compostos (Dias *et al.*, 2014).

A interação entre a proteína e seu ligante pode ser mediada por meio de moléculas de água, proporcionando a estabilização do complexo proteína-ligante. Contudo, os resultados de RMSD obtidos com água corroboram que em alguns casos essas moléculas podem interferir e blindar algumas interações importantes do ligante com a proteína, diminuindo desta forma a afinidade, como relatado por Roberts & Mancera (2008). Assim, neste estudo, as moléculas de água foram retiradas.

A função de ranqueamento selecionada (GOLDScore) é uma função nativa do programa GOLD que se baseia em quatro parâmetros: energia de ligação de hidrogênio entre proteína-ligante, energia van der Waals entre proteína-ligante, energia interna de van der Waals do ligante e energia de torção interna do ligante. Opcionalmente, um quinto parâmetro pode ser adicionado: a energia interna de ligação de hidrogênio do ligante (CCDC, 2019).

#### 4.1.2. Resultados do ancoramento dos compostos propostos

A modelagem molecular foi realizada inicialmente com o objetivo de orientar as sínteses dos compostos planejados. As moléculas propostas das séries 1 e 2 foram ranqueadas de acordo com a média aritmética do valor de RMSD das melhores poses (Anexo I). Ao observar os valores, é possível inferir que os substituintes R<sub>1</sub> com grupos doadores e aceptores de elétrons destacam-se na otimização do análogo **30**, contudo os valores não apresentam diferenças significativas que indiquem uma possível melhor atividade dos compostos nas três primeiras posições, se comparados aos demais. Isso pode ser evidenciado pelos valores obtidos de ranqueamento, como demonstrado na Tabela 1, a seguir, com as dez melhores poses de moléculas e, ademais, pelas soluções apresentadas pela ancoragem, revelando interações com resíduos importantes do sítio catalítico.

Os dados obtidos inferem que as moléculas da série 1 apresentaram melhores soluções comparadas às da série 2. Contudo, duas moléculas da série 2 se destacaram por estarem entre as 5 melhores soluções e, uma delas (**2h**), como a melhor solução. Ao analisar as poses no topo do ranking, a molécula **2h** demonstrou interações com os resíduos Phe31 e Asp27 (Figura 10A). O resíduo Asp27 compõe um sítio com afinidade ao GOL adjacente ao sítio catalítico da enzima, pertencente apenas à enzima micobacteriana (Dias *et al.*, 2014), e provavelmente conferindo seletividade à *Mt*DHFR. Esta interação se



deve provavelmente ao deslocamento retroisostérico do átomo de nitrogênio planejado para a série 2, permitindo que o substituinte R<sub>1</sub> tenha um melhor acesso a este sítio.

**Tabela 1:** Dez melhores poses das moléculas (séries 1e 2) ordenadas pela média do ranqueamento.

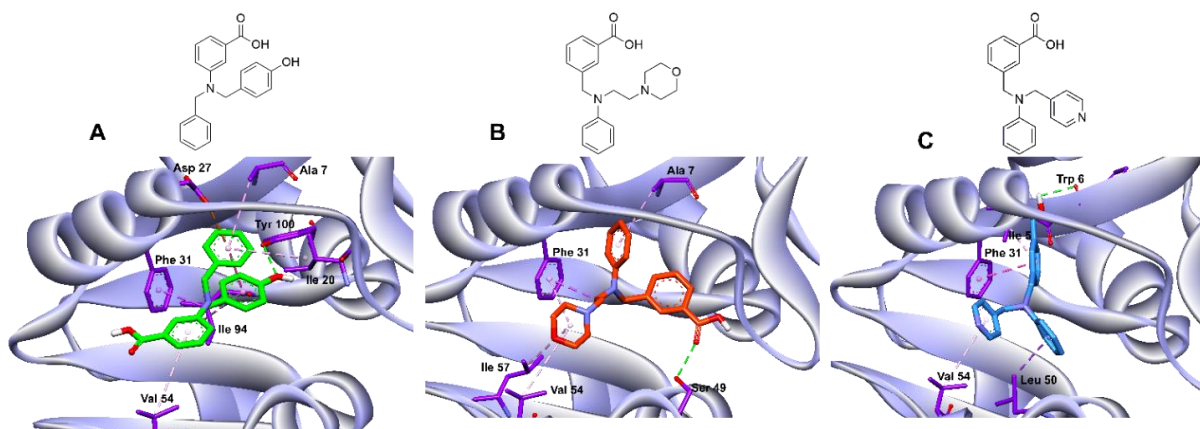
Molécula	R <sub>1</sub>	Ranqueamento
<b>2h</b>	<i>p</i> -hidroxibenzil	65,13
<b>1i</b>	<i>N</i> -etilmorfolinil	64,91
<b>1e</b>	<i>m</i> -metilpiridil	64,50
<b>2l</b>	acetilamino	64,21
<b>1l</b>	acetilamino	64,18
<b>1k</b>	benzenossulfonil	64,12
<b>1h</b>	<i>p</i> -hidroxibenzil	63,99
<b>1g</b>	<i>m</i> -hidroxibenzil	62,92
<b>1b</b>	etilfenil	62,91
<b>1c</b>	1-metilpiridil	62,86

Por sua vez, a molécula **1i** apresenta uma cadeia flexível que permite a interação com resíduo alvo Phe31 e o acesso ao resíduo Ala7 (Figura 10B). Essa interação com Ala7 ocorre também com a porção pteridínica do MTX e o anel nicotinamídico do NADPH, como relata Li *et al.* (2000). Portanto estas interações podem indicar um melhor aproveitamento e interação com o sítio catalítico da *Mt*DHFR.

A terceira melhor pose ranqueada (**1e**) apresenta interações principalmente com os resíduos Phe31, Val54 e Ile5 (Figura 10C), demonstrando uma afinidade com o bolso hidrofóbico constituinte do sítio catalítico da enzima, região onde originalmente há a interação com a porção *p*-aminobenzóica do MTX (Dias *et al.*, 2020). Entretanto não são identificadas interações com resíduos pertencentes ao bolso com afinidade ao GOL, o que pode significar falta de seletividade para esta isoforma.

A interação com o resíduo Phe31 para as três melhores poses de **2h**, **1i** e **1e** ocorre por meio da região que possui o nitrogênio, de modo semelhante ao ocorrido com a metila ligada ao nitrogênio no MTX, como descrito por Dias *et al.* (2020). É possível verificar que

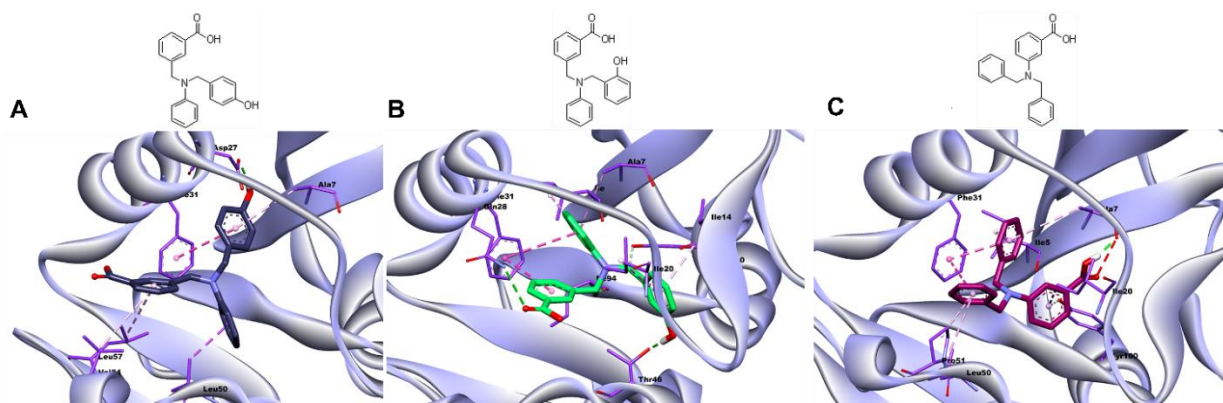
os três compostos tiveram suas melhores conformações, apresentando afinidade com a região do bolso hidrofóbico do sítio ativo.



**Figura 10:** Interação dos ligantes **2h** (A), **1i** (B) e **1e** (C) com resíduos do sítio catalítico da *MtDHFR*.

Entretanto, estas interações estão presentes também nos demais compostos das séries 1 e 2 (Figura 11), o que indica que a diferença em seus resultados pode ser apenas a distância entre os resíduos e os grupos dos análogos. É possível observar nas figuras 11A e 11B que as moléculas **1h** e **1g** realizam, além da interação com o resíduo Phe31, também interações com os resíduos Asp27 e Gln28, respectivamente, correspondentes ao sítio com afinidade ao GOL, indicando uma possível seletividade a *MtDHFR*. Por sua vez a molécula **2a** (Figura 11C) realiza interações com resíduos do backbone como Ala7 além de interagir com Phe31, apresentando um comportamento semelhante ao composto **1i**.

Desta forma, com estes resultados, não há porque orientar a síntese por substituintes específicos. Todavia, as duas séries não apresentam interação com o resíduo Arg60, outro importante ponto de interação do sítio ativo devido a sua correlação com a função catalítica da enzima (Dias *et al.*, 2014). Esta falta de interação ocorre, em sua maioria, devido ao tamanho reduzido das moléculas e seus deslocamentos para porções mais profundas do sítio, mais próximas da região onde originalmente ocorre a interação com a porção pteridínica do ácido di-hidrofólico (Li *et al.*, 2000).

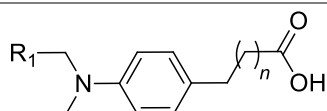


**Figura 11:** Interação dos ligantes **1h** (A), **1g** (B) e **2a** (C) com resíduos do sítio catalítico da *MtDHFR*.

A hipótese da interação do composto **30** com um sítio alostérico formado pelos resíduos Arg32 e Arg60 (presentes na *MtDHFR* e *hDHFR*) realizada por Kronenberger *et al.* (2020), corrobora o planejamento de outras moléculas, uma vez que os análogos presentes na série 1 e 2 podem possuir comportamento idêntico, excluindo uma possível seletividade dos inibidores planejados. Estes novos dados somam-se aos resultados da ancoragem das séries 1 e 2, que demonstraram a falta de interação com o resíduo Arg60 e embasam o planejamento das duas novas séries 3 e 4. Notavelmente, estas duas séries (3 e 4) possuem uma extensão de cadeia que pode permitir a interação com os resíduos mais profundos do sítio, com os resíduos do bolso acessório e com o resíduo Arg60, mais distante e exteriorizado na proteína.

As moléculas propostas foram então submetidas aos estudos de ancoragem molecular e os resultados foram ordenados conforme a média aritmética dos valores de RMSD (Anexo I). A Tabela 2, a seguir, apresenta a seleção com as dez melhores poses das moléculas.

**Tabela 2:** Dez melhores poses das moléculas (séries 3 e 4) ordenadas pela média do ranqueamento.

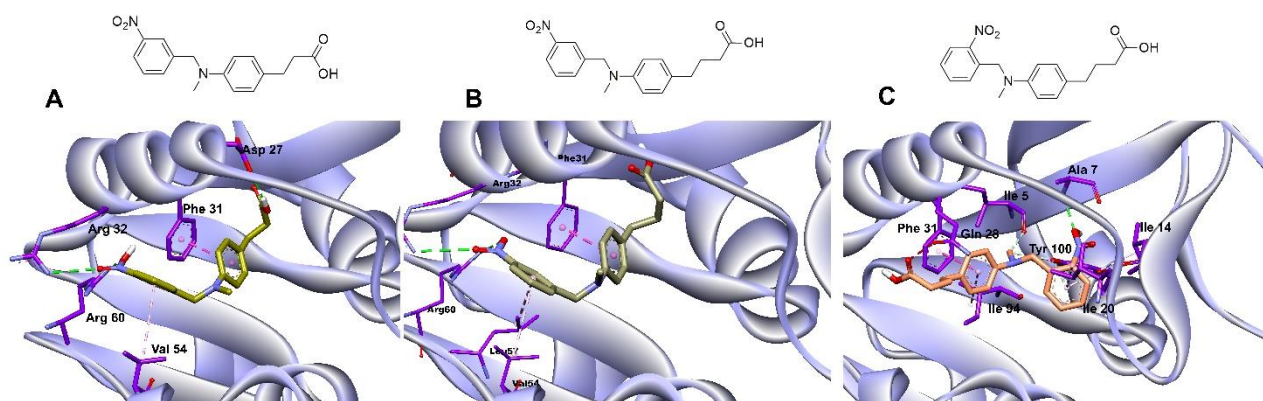


Molécula	R <sub>2</sub>	n	Ranqueamento
<b>3x</b>	<i>m</i> -nitrofenil	3	69,02
<b>4x</b>	<i>m</i> -nitrofenil	4	65,29
<b>4w</b>	<i>o</i> -nitrofenil	4	64,07
<b>3t</b>	<i>o</i> -etinilfenil	3	63,89
<b>3u</b>	<i>m</i> -cianofenilr	3	63,59

<b>4z</b>	<i>p</i> -metilpiridil	4	63,40
<b>3w</b>	<i>o</i> -nitrofenil	3	62,97
<b>4s</b>	<i>m</i> -etinilfenil	4	62,73
<b>4t</b>	<i>o</i> -etinilfenil	4	62,71
<b>4m</b>	<i>m</i> -carboxi-fenil	4	62,53

A análise dos estudos de ancoramento revelou resultados semelhantes aos encontrados para as séries 1 e 2. Novamente os valores obtidos foram próximos entre as moléculas planejadas, e desta forma não há por que orientar a síntese a partir das moléculas melhores ranqueadas. Contudo os resultados foram superiores às séries 1 e 2 e isso sugere que as séries 3 e 4 apresentam substituintes e uma estrutura que pode permitir uma melhor afinidade com o bolso e seletividade para a *Mt*DHFR. Os substituintes em R<sub>1</sub> doadores e aceptores de elétrons destacam-se na interação com o sítio catalítico.

Dentre os análogos, ressaltam-se os nitrocompostos que promovem efeito indutivo quando presentes em posição *meta*, ou efeito de ressonância quando em posições *orto* e *para*, podendo favorecer a interação dos sistemas aromáticos com variados resíduos de aminoácidos (Olender *et al.*, 2018). A molécula **3x** apresenta, em sua melhor pose (Figura 12A), interações similares às moléculas **20** e **21** elaboradas por Lele *et al.* (2016) no sítio catalítico da *Mt*DHFR. O anel aromático apresenta interação do tipo empilhamento  $\pi$  com o resíduo Phe31, e sua cadeia alifática interage com o resíduo Asp27. Por sua vez o grupo nitrobenzol interage com o resíduo Arg60 presente na entrada do sítio. Visualiza-se uma melhor ocupação do sítio catalítico e uma possível melhora em sua ação inibitória. A interação com o resíduo Asp27, constituinte do bolso do GOL, pode indicar possível seletividade à *Mt*DHFR.



**Figura 12:** Interação dos ligantes **3x** (A), **4x** (B) e **4w** (C) com os resíduos do sítio catalítico da *Mt*DHFR

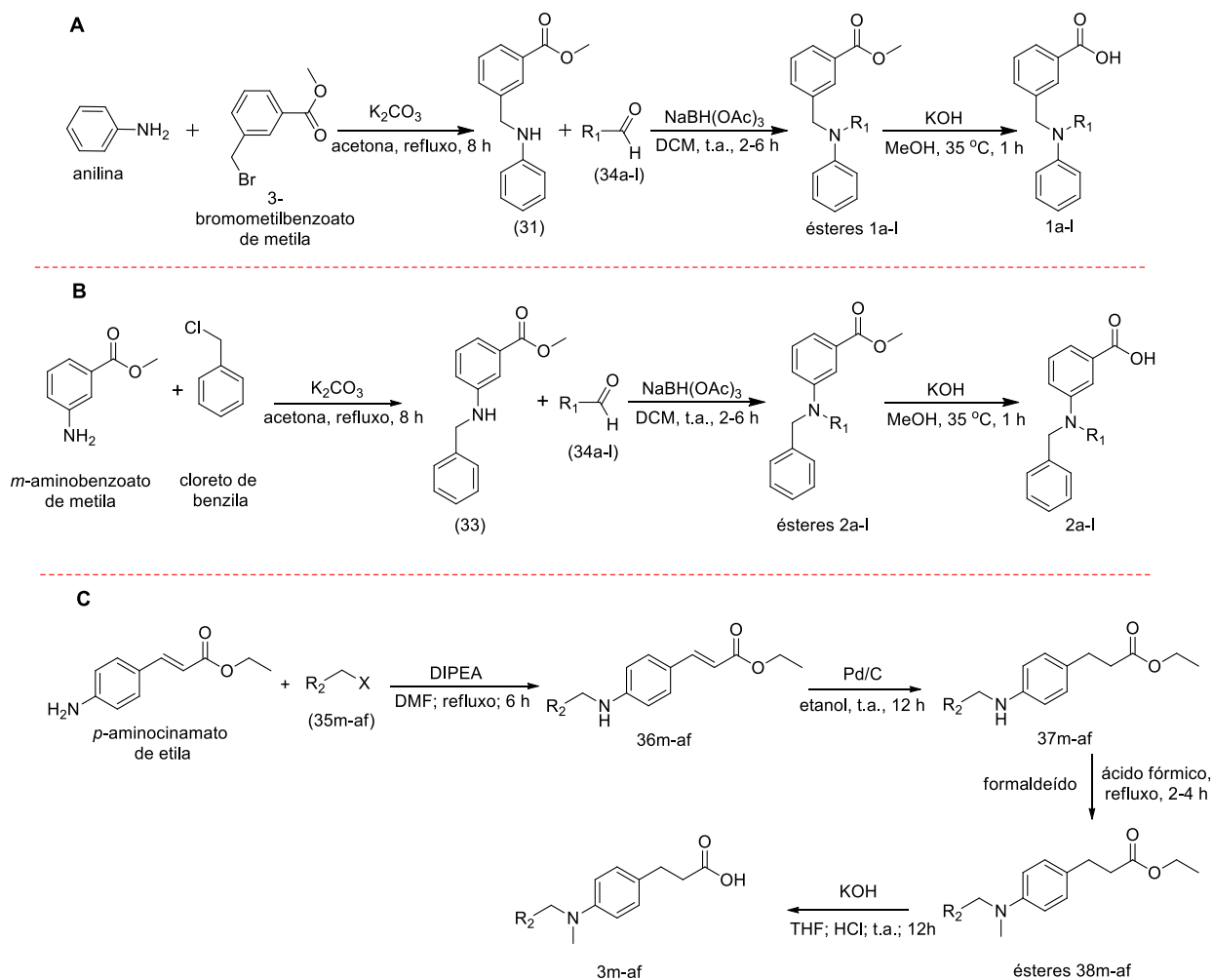
A interação com o resíduo Arg60 é novamente visualizada com a pose da molécula **4x** (Figura 12B) por meio do grupo nitro, isto somado ao seu ranqueamento indica melhor interação desse anel quando comparado aos demais. É possível inferir que a inclusão de cadeias alifáticas flexíveis com o grupo carboxílico permitiu uma melhor ocupação do sítio catalítico da *MtDHFR* e interação com sítio adjacente com afinidade ao GOL, uma vez que este bolso possui características hidrofílicas (Hong *et al.*, 2015). Esta interação é visualizada por meio da presença do resíduo Asp27 e Gln28 nas poses das moléculas **3x** e **4w** (Figuras 12A e 12B) respectivamente.

Isto posto, a análise dos ensaios de ancoramento das séries 3 e 4 revelou que as modificações planejadas para as regiões **A** e **C** permitiram, além de maior ocupação do sítio catalítico da *MtDHFR*, ampliar as interações com os resíduos existentes. Ademais, favoreceu a interação do tipo empilhamento  $\pi$  entre os anéis aromáticos centrais das moléculas e o resíduo Phe31, possibilitando o acesso a resíduos antes não explorados (Tyr100, Ile94) com as séries 1 e 2 (Figura 10C).

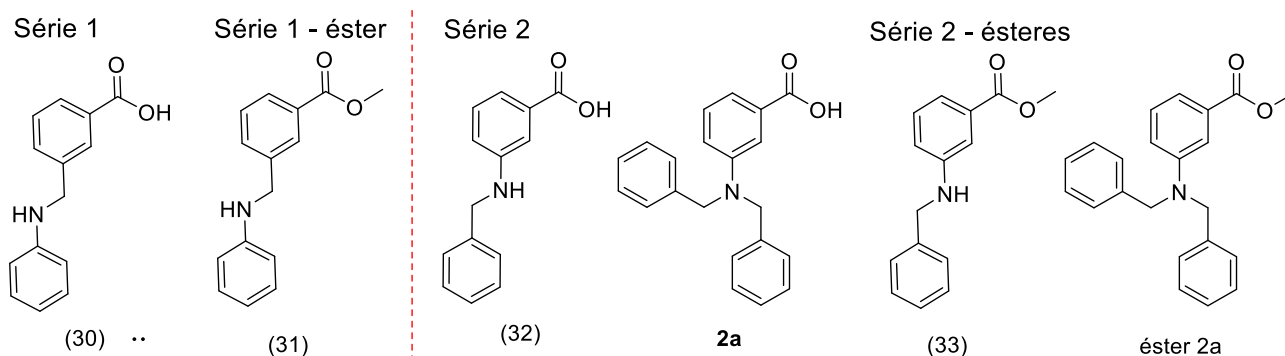
A partir destes resultados não foi possível elencar moléculas para orientar a síntese e posterior avaliação biológica. Assim sendo, inicialmente foram escolhidos os compostos com substituintes menos complexos para exploração e otimização de rotas sintéticas.

## 4.2. SÍNTESE DOS COMPOSTOS

As sínteses dos compostos seguiram as rotas apresentadas no Esquema 1, a seguir. Para as séries 1 e 2 foram utilizados procedimentos baseados nos estudos de Kronenberger *et al.* (2020), Abdel-Magrid *et al.* (1996) e Khurana *et al.* (2004) (Esquema 1A e 1B). Para as séries 3 (Esquema 1C) e 4 optou-se por partir dos estudos de Link *et al.* (2004), McAllister *et al.* (2019) e Yang *et al.* (2018). Seguindo estas rotas foram sintetizados e caracterizados os compostos **30**, **31**, **32**, **33** e um produto final da série 2 (**2a**), além de seu respectivo precursor éster (Figura 13). Os dados de caracterização e rendimentos dos específicos produtos estão descritos nos itens subsequentes.



**Esquema 1:** Rotas sintéticas utilizadas para formação dos compostos. A: Série 1; B: Série 2; C: Série 3.



**Figura 13:** Produtos sintetizados.

#### 4.2.1. Síntese dos compostos das séries 1 e 2

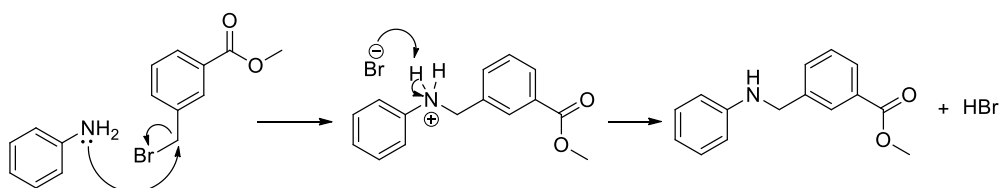
Para a síntese dos compostos das séries 1 e 2 foi utilizada a metodologia descrita por Kronenberger *et al.* (2020), originando os compostos **31** e **33**, que foram submetidos à reação de aminaçãõ redutiva (Abdel-Magrid *et al.*, 1996) com variados aldeídos (**34a-I**), com o objetivo de originar os ésteres precursores dos produtos finais. Contudo as análises de caracterização revelaram que os produtos não foram obtidos ou apresentavam

impurezas, sendo necessário o estudo e a aplicação de novos métodos de purificação. Os compostos **31** e **33** foram submetidos à hidrólise (Khurana *et al.*, 2004) para obtenção de suas versões ácidas para futura comparação de efetividade nos ensaios enzimáticos e antimicrobianos.

#### 4.2.1.1. Síntese dos intermediários ésteres **31** e **33**

O composto **31** (éster 3-metil-(fenilamino)metil benzoato de metila) foi sintetizado com um rendimento de 50%, apresentando-se como um óleo amarelo (*cf.* Esquema 1A). Esta reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) e o produto foi purificado por cromatografia em coluna (CC).

A reação para a obtenção desse intermediário deu-se por mecanismo de substituição nucleofílica tipo 2, representado a seguir de forma simplificada (Esquema 2), com formação de ácido bromídrico como subproduto. O íon brometo funciona como base, retirando o próton e estabilizando o produto da reação. Como subproduto, o ácido bromídrico é neutralizado pelo carbonato de potássio existente em excesso no meio, condição que favorece o aumento da nucleofilicidade dos reagentes pela ação desprotonante do carbonato (Clayden *et al.*, 2001).



**Esquema 2:** Mecanismo simplificado de substituição nucleofílica tipo 2.

A caracterização de **31** foi realizada por meio de espectro de Ressonância Magnética Nuclear - RMN  $^1\text{H}$ , representado na Figura 14. O produto pôde ser identificado principalmente pelo aparecimento do sinal na forma de um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  4,30 partes por milhão (ppm), referente aos hidrogênios do carbono 8. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 15) corrobora os dados ao apresentar um sinal em  $\delta_{\text{C}}$  52,1 ppm, referente ao carbono 8, e um sinal em 48,0 ppm, proveniente do carbono 15 do éster metílico.

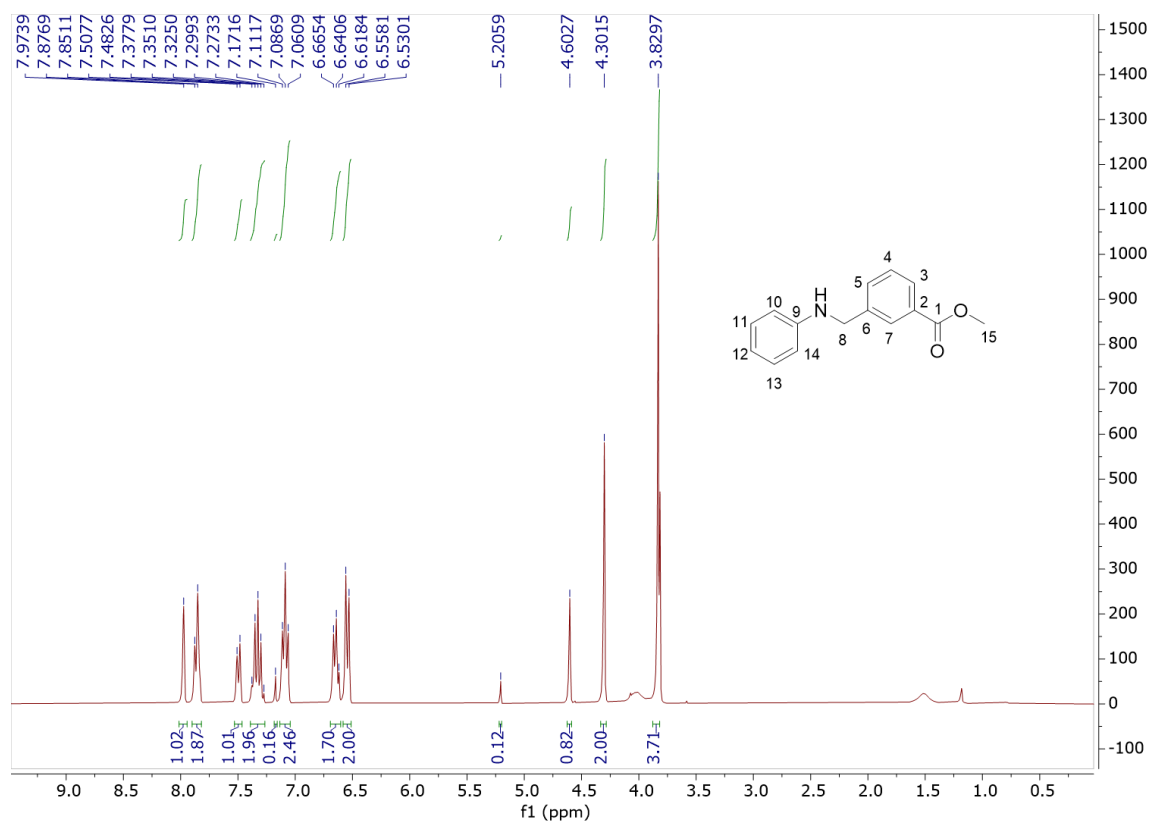


Figura 14: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **31**( $\text{CDCl}_3$ ).

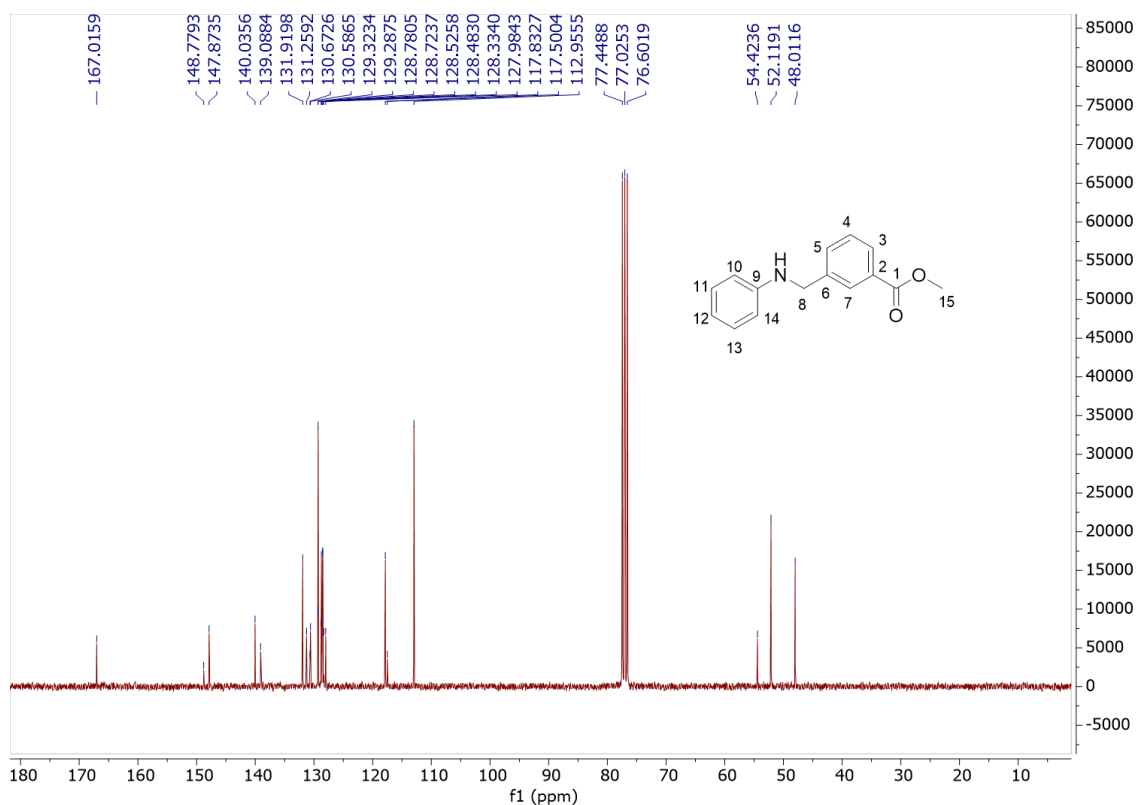


Figura 15: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **31** ( $\text{CDCl}_3$ ).

O composto **33** ou 3-(benzilamino)benzoato de metila foi sintetizado com um rendimento de 50%, apresentando-se como um sólido amarelo. Esta reação ocorre

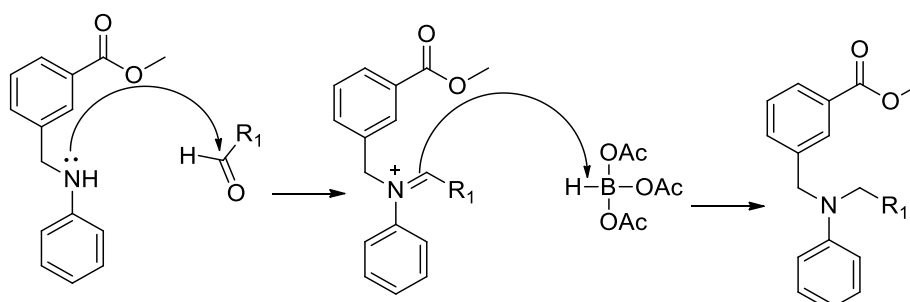


novamente por mecanismo de substituição nucleofílica, sendo mais uma vez necessária a purificação por CC. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresenta o sinal na forma de um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  4,38 ppm referentes aos hidrogênios do carbono 8, podendo ser também visualizado no Anexo II.

#### 4.3.2. Síntese dos produtos finais das séries 1 e 2

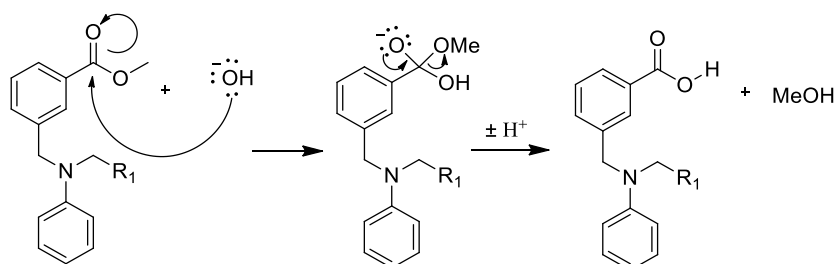
Os produtos finais **2h** e **2a** foram obtidos como um óleo amarelo e um sólido castanho, e com rendimentos brutos de 5%, e 70%, respectivamente, por meio de diferentes metodologias, apresentadas a seguir (Abdel-Magrid *et al.*, 1996; Khurana *et al.*, 2004; Link *et al.*, 2004). A reação foi acompanhada por CCD e para o composto **2h** foi necessária a realização de purificação por CC. Os produtos foram caracterizados por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

A reação para a obtenção do intermediário éster **2h** ocorre por aminação redutiva, representado a seguir, de forma simplificada (Esquema 3). O triacetoxiborohidreto de sódio funciona como redutor do íon imínio formado na reação, estabilizando a ligação e formando o produto (Clayden *et al.*, 2001).



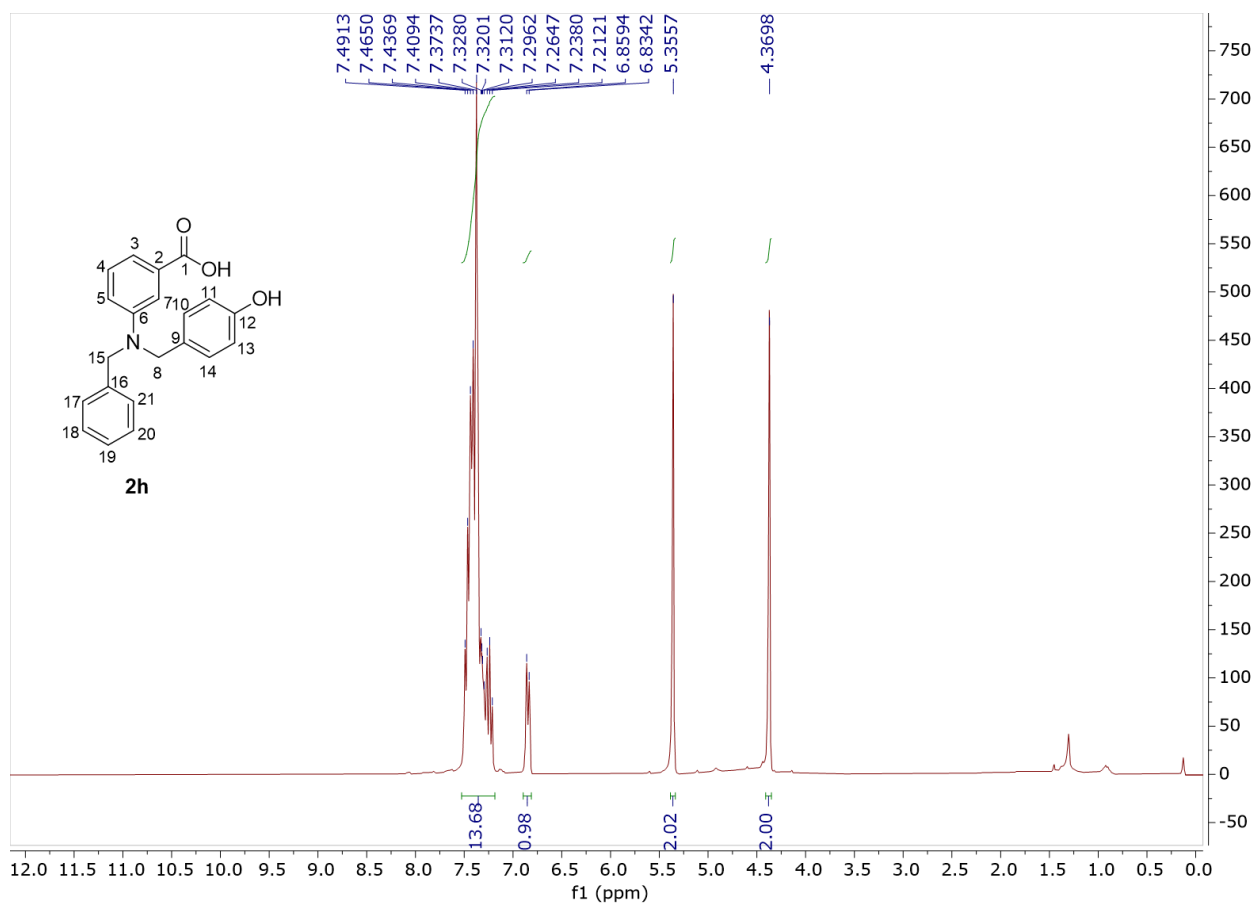
**Esquema 3:** Mecanismo simplificado de aminação redutiva (Clayden *et al.*, 2001).

O intermediário éster **2h** foi então submetido à hidrólise alcalina conforme representado pelo mecanismo simplificado no Esquema 4. A carbonila sofre uma adição nucleofílica do ânion hidróxido, formando um intermediário tetraédrico instável. O substituinte alcóxi é um bom grupo abandonador, que ao ser eliminado estabiliza a molécula, obtendo-se assim os produtos finais desejados.



**Esquema 4:** Mecanismo simplificado de hidrólise alcalina (Clayden *et al.*, 2001).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 16) da molécula **2h** indica a obtenção do composto, pois é possível verificar a presença de dois sinais, na forma de singletos, em  $\delta_{\text{H}}$  4,36 e 5,35 ppm, referentes aos hidrogênios dos carbonos 8 e 15, respectivamente. Todavia, não foi possível definir o deslocamento do hidrogênio da hidroxila do grupo fenólico. Esses dados são confirmados pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  48,9 e 66,1 ppm referentes aos carbonos 8 e 15 respectivamente e ao sinal em  $\delta_{\text{C}}$  166,7 ppm referente ao carbono da carboxila no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 17).



**Figura 16:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **2h** ( $\text{CDCl}_3$ ).

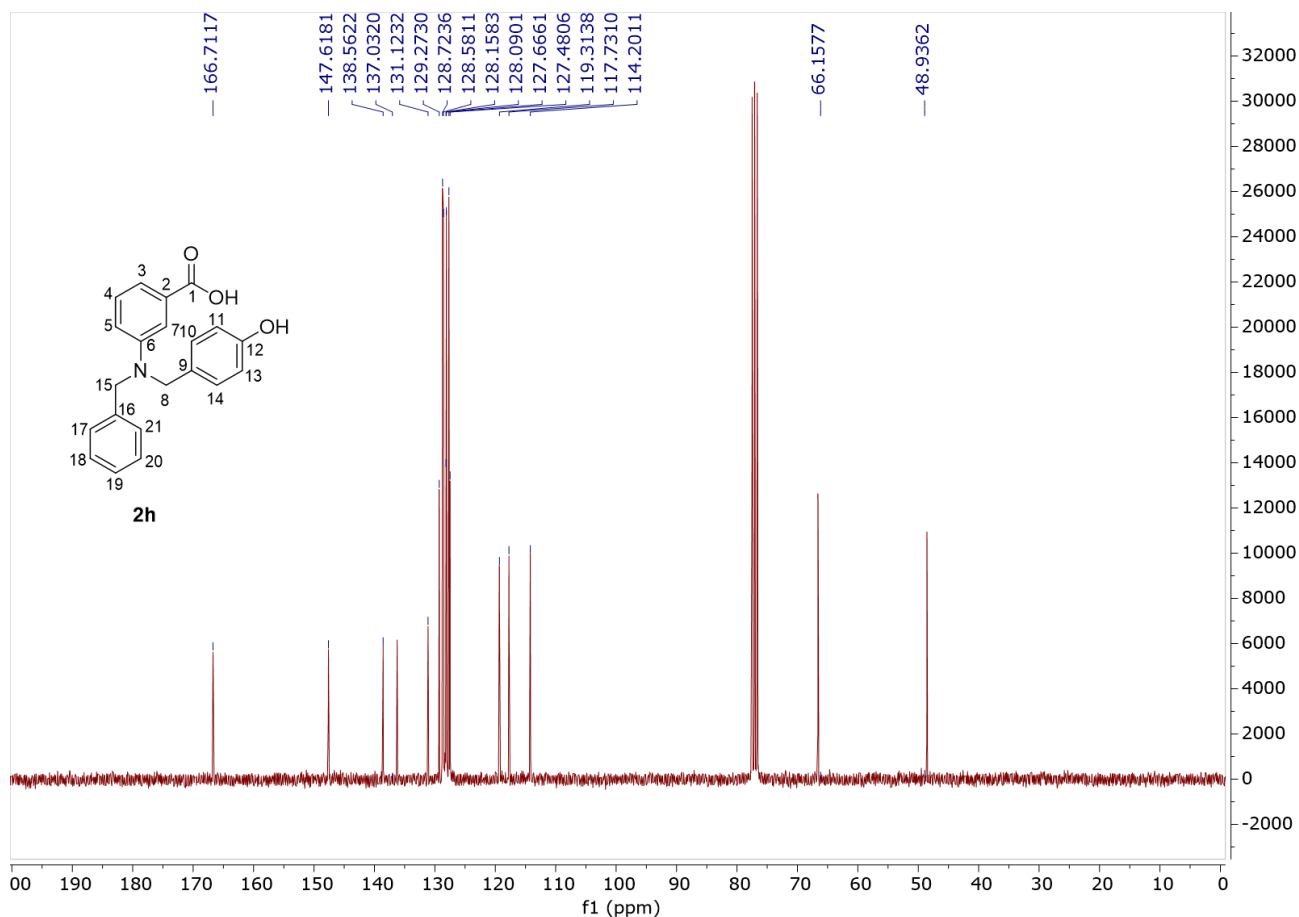
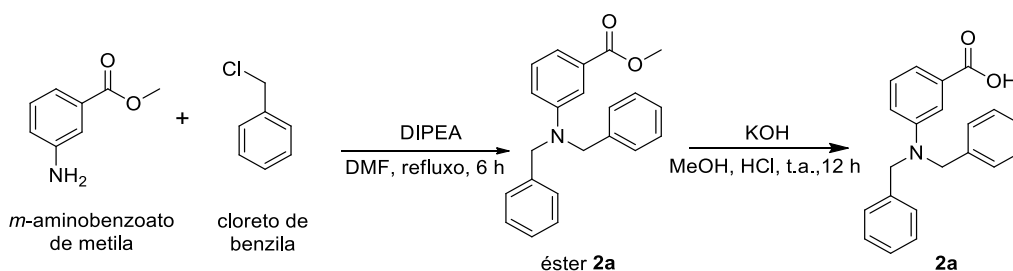


Figura 17: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **2h** ( $\text{CDCl}_3$ ).

O composto **2a** foi obtido por meio de metodologia diferente da apresentada no Esquema 1. A reação foi acompanhada por CCD e realizada a purificação por CC.

#### 4.3.2.1. Síntese do intermediário éster **2a**

A condição utilizada para a síntese dos demais compostos da série 2 mostrou-se infrutífera para a obtenção de **2a**, sendo necessária a utilização de outra condição. Ao analisar os substituintes em  $R_1$  para a formação dos produtos, verificou-se que, para a obtenção do composto **2a**, a reação de formação da molécula **33** pode ser adaptada para uma condição que promova uma dialquilação da amina primária como observado em Link *et al.* (2004). Ao utilizar desta condição, não apenas o precursor éster de **2a** foi obtido como sequencialmente **2a**, conforme representado no Esquema 5.

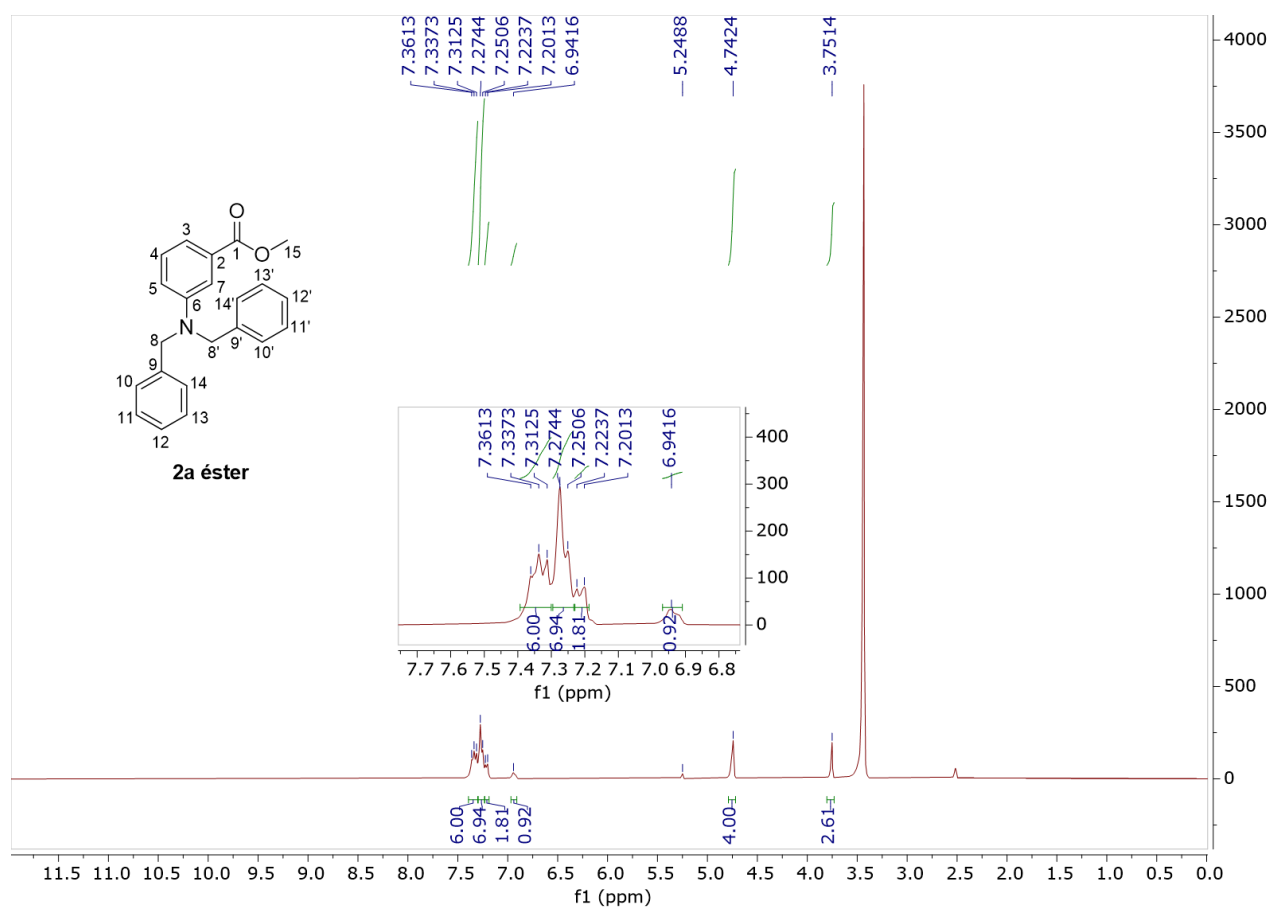


Esquema 5: Rota sintética do produto **2a**.

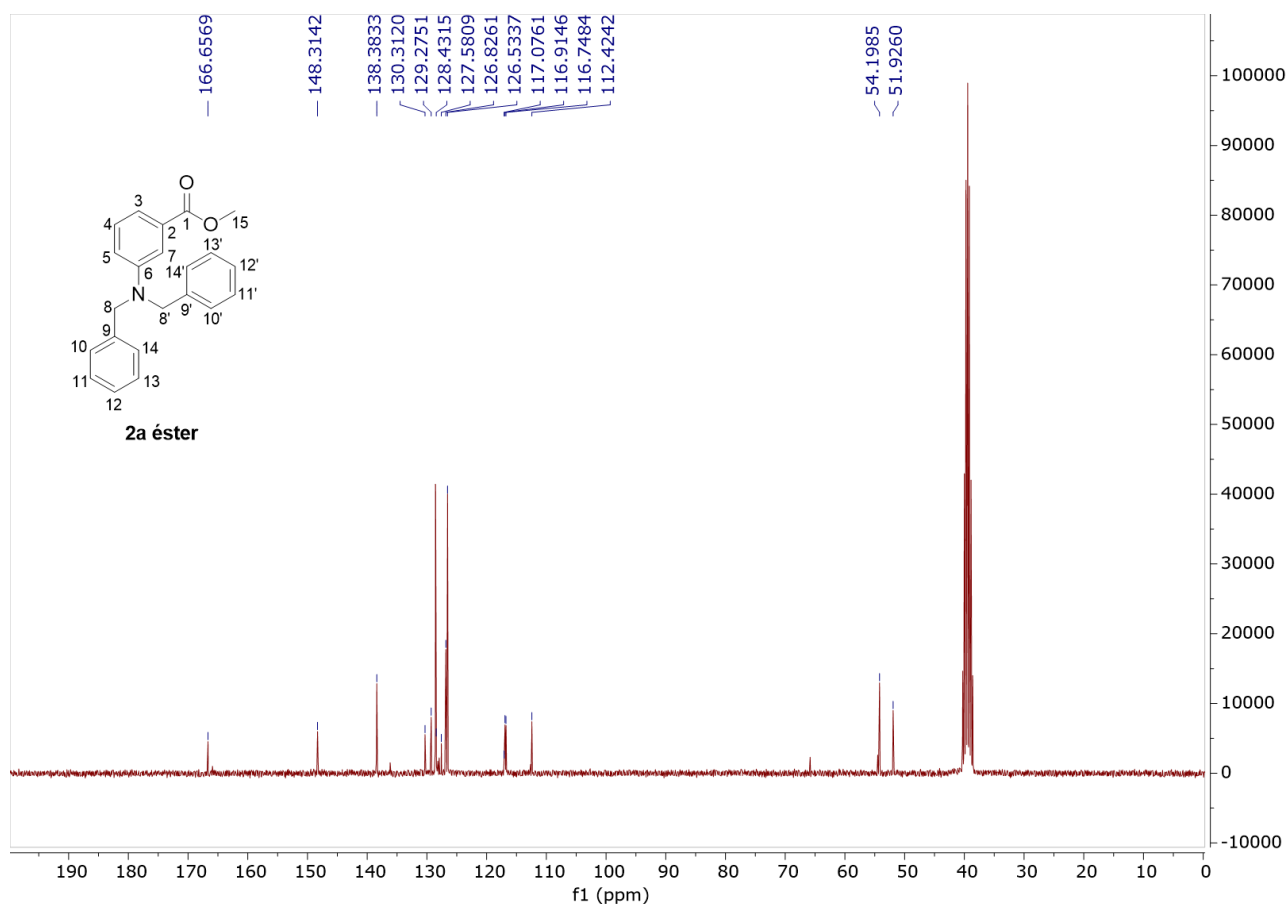
O éster **2a** (3-(dibenzilamino)benzoato de metila) foi sintetizado com sucesso e com um rendimento de 95% (*cf.*Esquema5). Esse composto se apresentou como um sólido branco cristalino. A reação de obtenção ocorre também pelo mecanismo de substituição nucleofílica tipo 2, conforme apresentado anteriormente no Esquema 2.

Durante a síntese, a CCD de acompanhamento apresentou duas manchas distintas após consumo total dos materiais de partida. Estes produtos foram inicialmente denominados A e B para realizar a purificação por CC e posterior caracterização por RMN. Com a caracterização destes compostos, identificou-se que A era o intermediário éster **2a**.

A Figura 18 apresenta o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do intermediário éster **2a**. A caracterização e confirmação da formação do composto ocorre pela presença do singlete em  $\delta_{\text{H}}4,74$  ppm, referente aos hidrogênios dos carbonos 8 e 8' provenientes das metilas ligadas ao nitrogênio e pela presença do singlete em  $\delta_{\text{H}}3,75$  ppm referente aos hidrogênios do carbono15, cujo sinal é característico da metila do éster. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentado na Figura 19 corrobora a informação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  pela presença do sinal em  $\delta_{\text{C}}54,1$  ppm referente aos carbonos 8 e 8'.



**Figura 18:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do éster **2a** (DMSO- $d_6$ ).



**Figura 19:** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do éster **2a** (DMSO-*d*<sub>6</sub>).

O subproduto da reação, denominado B, foi caracterizado por meio do RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Verificou-se que se tratava do produto final **2a**. Ele se apresenta na forma de um sólido branco cristalino. A formação deste pode ser explicada por condições reacionais específicas como tempo elevado em refluxo de DMF, um solvente que em determinadas condições pode também exercer ação de catálise (Heravi *et al.*, 2018). O excesso de tempo foi utilizado inicialmente para garantir a formação total do produto de acordo com a rota sintética utilizada, ocasionando a formação do subproduto.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 20) para o composto **2a** apresenta o sinal de singlete em  $\delta_{\text{H}} 4,73$  ppm, característico dos quatro hidrogênios presentes nos carbonos 8 e 8'. Contudo, não é possível observar o sinal em  $\delta_{\text{H}} 3,75$  ppm proveniente dos hidrogênios da metila, confirmando assim a formação do ácido. Os dados são corroborados pelo espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 21), que apresenta o sinal em  $\delta_{\text{C}} 54,6$  ppm referente aos carbonos 8 e 8' provenientes dos metilenos ligados ao nitrogênio. Devido à simetria dos anéis aromáticos, os sinais dos carbonos estão sobrepostos nas mesmas regiões de deslocamento químico, dificultando a análise. No entanto, a ausência do sinal em  $\delta_{\text{C}} 51,9$  ppm referente à metila do éster contribui para a identificação do produto B como sendo a molécula **2a**.

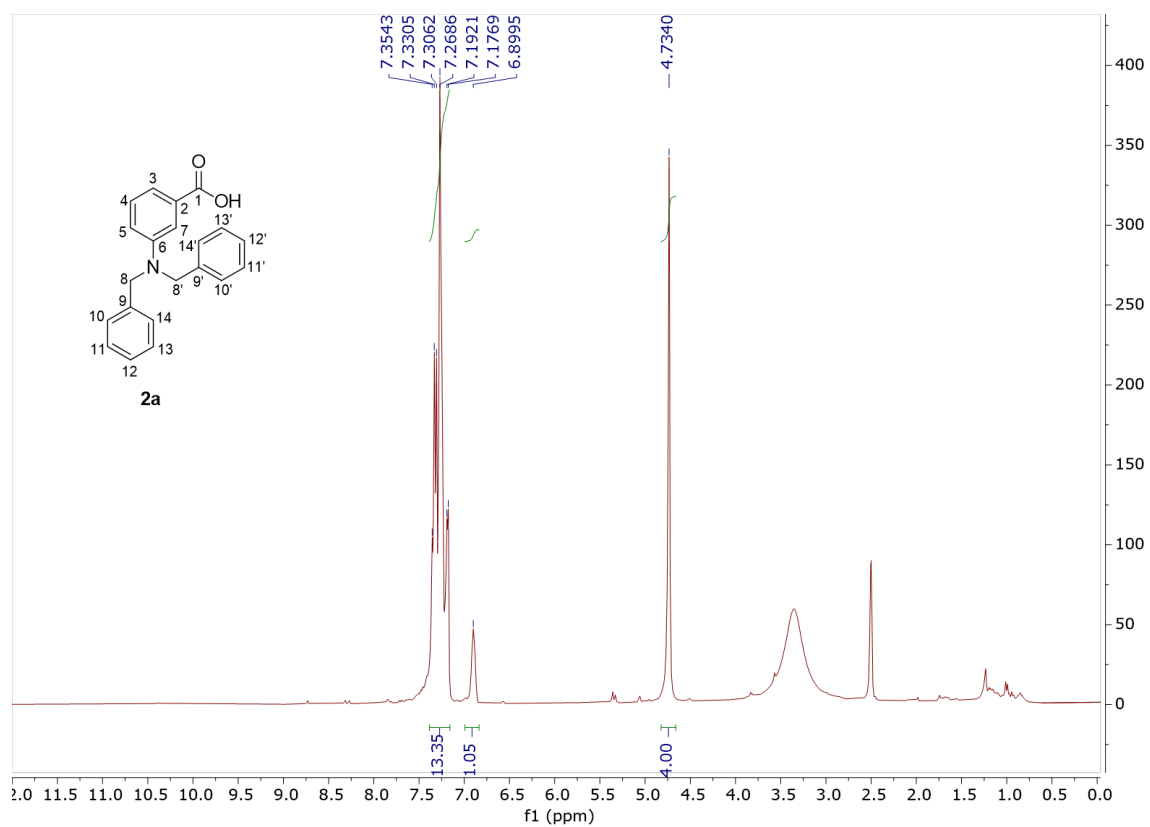


Figura 20: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **2a** (DMSO- $d_6$ ).

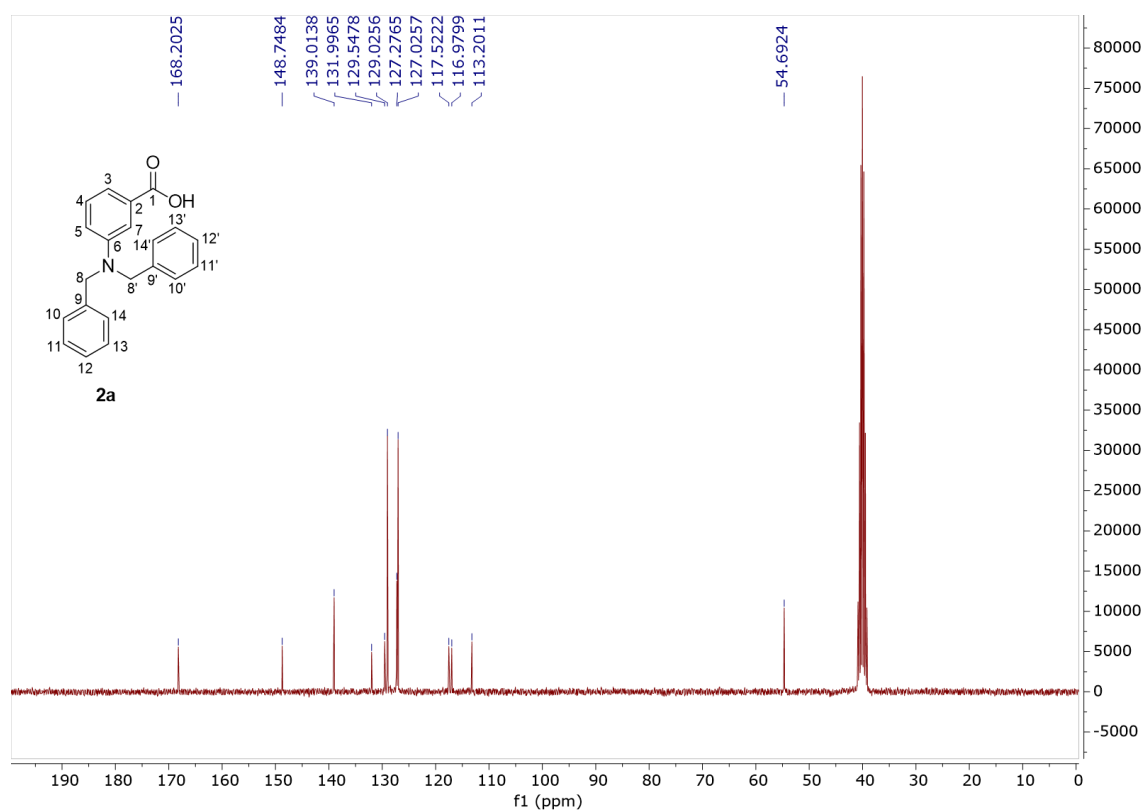


Figura 19: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **2a** (DMSO- $d_6$ ).

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho consistiu no planejamento, *docking* molecular, síntese e avaliação da atividade inibitória e enzimática de compostos análogos do ácido aminobenzóico e do ácido para-aminocinâmico. No total foram planejadas 64 moléculas divididas em 4 séries de acordo com os análogos formados.

As moléculas propostas foram avaliadas por meio de *docking* molecular com o intuito de orientar a síntese dos compostos. Dentre as 64 moléculas, seis (duas da série **1**, uma da série **2**, uma da série **3** e duas da série **4**) apresentaram as melhores poses, mas seus valores próximos (65,13; 64,91; 64,50; 69,02; 65,29 e 64,07) não indicavam uma orientação para a síntese.

Os estudos de modelagem molecular revelaram que as modificações sugeridas podem indicar uma melhor interação com o alvo. O retroisosterismo proposto para o nitrogênio do composto **30** pode aumentar a seletividade de seus análogos para a enzima *MtDHFR*. A extensão da cadeia planejada para a série **3** também se mostrou benéfica ao apresentar uma melhor ocupação do sítio catalítico e interação com os resíduos de aminoácidos.

Foram sintetizados os ésteres 3-(metilfenilamino) benzoato de metila e 3-(benzilamino) benzoato de metila utilizados como intermediários para as séries **1** e **2** respectivamente e dois análogos da série **2**.

As condições reacionais foram simples, contudo poucos produtos foram obtidos e em rendimentos variados. Os processos sintéticos se mostram viáveis mesmo com a utilização de técnicas como cromatografia em coluna para obtenção dos produtos. Isso se deveu a características inerentes aos reagentes selecionados. A existência de uma pandemia durante o período de execução do projeto, prejudicou o desenvolvimento do trabalho prático durante parte do período proposto para os experimentos práticos. O rendimento dos intermediários foi de 50%. Os produtos finais **2a** e **2h** apresentaram rendimentos de 5% e 70% respectivamente.

Não foi possível testar o produto obtido com relação a suas atividades inibitórias e enzimáticas.

Tendo em vista os resultados obtidos, propõe-se aprimorar as condições reacionais e testar os compostos para a sua atividade. Para tanto, sugere-se:

- Testar novas condições reacionais;
- Obter os demais compostos planejados;

- Testar os compostos sintetizados quanto a sua ação inibitória contra a enzima e contra o microrganismo.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. MÉTODOS COMPUTACIONAIS (*in silico*)

O estudo de ancoramento molecular foi conduzido com o intuito de elucidar o perfil de interação das moléculas propostas com a enzima alvo (*MtDHFR*). As moléculas primeiramente foram otimizadas, tendo sua energia minimizada por meio de mecânica molecular. Para isso, foram submetidas primeiramente ao campo de força MMFF (*Merck Molecular Force Field*), este campo equilibra a geometria e frequência vibracional de acordo com a combinação da energia de deformação e a energia de interação intramolecular (Halgren, 1996).

Posteriormente, foram novamente reotimizadas pelo método semi-empírico PM6 (*Parameterization method 6*). Assim, estados transicionais, funções de onda e a entalpia das moléculas puderam ser verificadas, visto que este método é elaborado para pequenas moléculas (Stewart, 2007; Stewart, 2009). Com o intuito de promover uma maior robustez aos dados de ancoragem molecular, as moléculas foram submetidas à otimização adicional pelo método de Hartree-Fock. Este método também verifica as funções de onda e estados transicionais, mas inclui nos cálculos as interações de orbitais de *spins* e considera que os elétrons podem se movimentar de formas diversas, dependendo do potencial do campo e das cargas do sistema (Slater, 1951). Todas as otimizações foram realizadas no programa Spartan versão 14'.

Para a validação do método, foram feitos *redockings* no programa GOLD, versão 2020.1, com o ligante co-cristalizado original (MTX) da enzima *MtDHFR*, variando o tamanho do raio do sítio da enzima. Foram escolhidos 5 tamanhos diferentes (6, 8, 10, 12, 14 Å) para verificar a interação da molécula com sítio alvo. O sítio, assim como a molécula NADPH, não foram alterados, pois, de acordo com estudos de Dias (2014), este composto parece exercer importante função para a ação catalítica do sítio ativo.

Variou-se a presença ou ausência de água no sítio e na enzima, com o intuito de verificar se as moléculas de água podem interferir ou auxiliar a interação no caso da *MtDHFR* (Roberts & Mancera, 2008). O GOL foi retirado da enzima, uma vez que a sua presença atrapalharia na análise da interação das moléculas planejadas com esse sítio acessório. Foram testadas todas as quatro funções de ranqueamento do programa GOLD (ChemPLP; GOLD; ASP e ChemScore). O método que apresentou o menor valor de RMSD



entre a estrutura do MTX co-cristalizado com a enzima e a molécula desenhada no programa Spartan'14 foi o escolhido para submeter as moléculas.

Os ancoramentos foram realizados em sextuplicata e utilizaram-se 10 poses para cada cópia das moléculas propostas. Utilizou-se a estrutura cristalográfica da enzima diidrofolato redutase do *Mycobacterium tuberculosis*, código *PDB*: 1df7 e resolução de 1,70 Å, disponível no banco Protein Data Bank (RCSB). Para a visualização da estrutura proteica e dos dados de ancoramento, foi usado o programa *Discovery Studio Visualizer*, Biovia, versão 16.1.0.

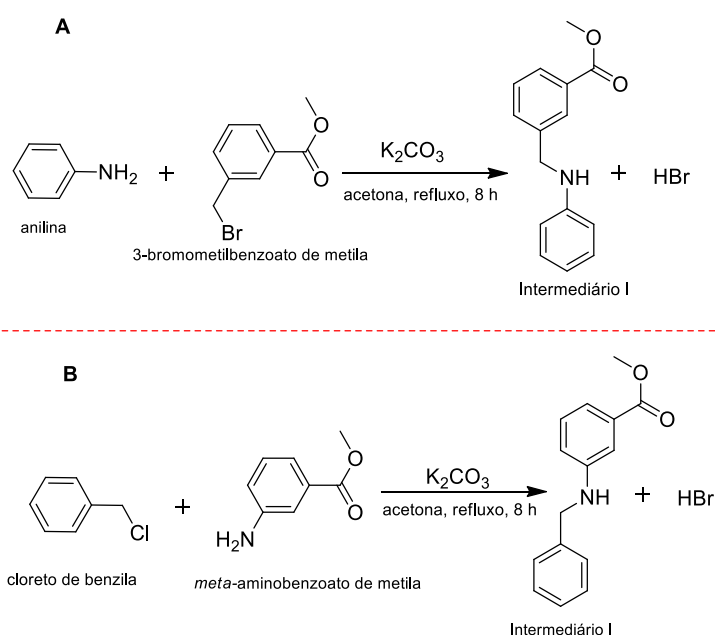
## 6.2. MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

Para o desenvolvimento da etapa sintética foram utilizados equipamentos, vidrarias e utensílios comuns à rotina laboratorial de síntese orgânica. Os solventes foram obtidos das empresas Merck®, Sigma-Aldrich® e Synth® e os reagentes das empresas Merck® e Sigma-Aldrich®.

## 6.3. MÉTODOS SINTÉTICOS

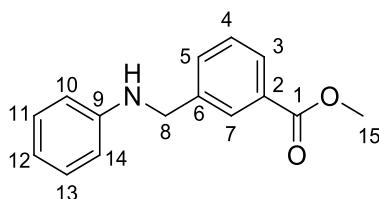
Os métodos utilizados para a obtenção dos derivados do ácido aminobenzóico e do ácido p-aminodiidrocinâmico e seus intermediários encontram-se descritos nos tópicos seguintes.

### 6.3.1. Síntese dos compostos 31 e 33

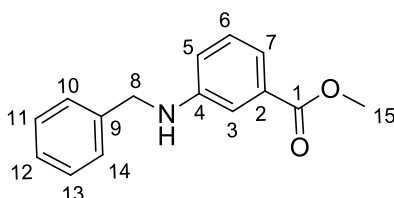


**Esquema 6:** Rota sintética para obtenção dos compostos 31 e 33.

Em um balão de fundo redondo adicionaram-se: 1 eq. de haleto, 1,2 eq. da amina, 3 eq. de carbonato de potássio e 5 mL/mmol de acetona, dimetilformamida (DMF) ou tetrahidrofurano (THF). O sistema foi mantido em refluxo por 8 horas. Ao término da reação, o solvente foi rotavevaporado e o produto foi extraído em funil de separação com 3 lavagens de acetato de etila e água em proporção 50/50%. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro. O produto foi purificado por CC em técnica de gradiente com sistema eluente hexano/acetato de etila.



**3-(metilfenilamino)benzoato de metila (31):** Produto obtido como um óleo amarelo em 70% de rendimento (168mg). RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): 7,97 (s, 1H; H7), 7,87 (d,  $J = 8\text{Hz}$ , 1H; H3), 7,50 (t,  $J = 12\text{ Hz}$ , 1H, H4), 7,35 (d,  $J = 16\text{ Hz}$ , 1H; H5), 7,11 (d,  $J = 14\text{Hz}$ , 1H, H13), 6,66 (d,  $J = 15\text{ Hz}$ , 2H; H11, H13), 6,55 (d,  $J = 8\text{ Hz}$ , 1H; H10); 4,6 (s, 1H, H7); 4,3 (s, 2H, H8); 3,82 (s, 3H, H15). RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): 167,0 (C1), 148,7 (C2), 147,8 (C3), 131,9 (C7), 129,3 (C4), 129,2 (C5), 128,7 (C6), 128,5 (C9), 128,4 (10), 117,8 (C14), 117,5 (C11), 112,9 (C13), 54,4 (C12), 52,1 (C8), 48,0 (C15).



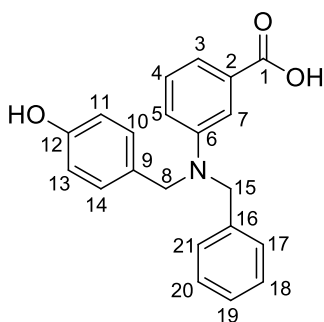
**3-(benzilamino)benzoato de metila (33):** Produto obtido como um sólido amarelo em 50 % de rendimento (120,5mg), pureza de 97%. RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): 7,47-7,21 (m, 9H; C3, C4, C5, C7, C10, C11, C12, C13, C14), 5,30 (s, 1H; NH), 4,38 (s, 2H, C8), 3,89 (s, 3H; C15). RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): 166,8 (C1), 147,6 (C2), 139,1 (C3), 131,2 (C7), 128,7 (C10, C14), 127,9 (C13, C11), 127,6 (C5), 120,0 (C12), 118,5 (C4), 114,8 (C9), 52,0 (C8), 46,7 (C15).

### 6.3.2. Síntese dos produtos finais das séries 1 e 2

A síntese do produto final **2h** ocorreu em duas etapas (cf. Esquema 1). Em um balão de fundo redondo adicionou-se: 1eq. do intermediário I, 1eq. do aldeído escolhido em 5mL

de diclorometano (DCM). Mantidos em agitação sob atmosfera de nitrogênio. 1,4 eq. de triacetoxiborohidreto de sódio são então adicionados e o sistema é deixado em agitação por no mínimo 2 horas. A fase orgânica é lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio e o solvente rotaevaporado. O produto é purificado por CC em técnica de gradiente com fase móvel hexano/acetato de etila.

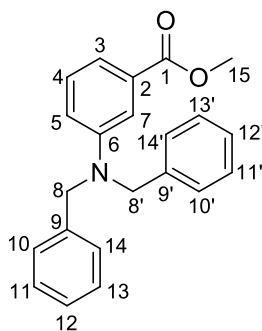
O produto obtido é solubilizado e colocado sob agitação em 3 mL de metanol. O sistema foi mantido a 35 °C por no mínimo uma hora. Ao término da reação, 10 mL de água são acrescentados ao sistema. A fase orgânica é retirada com funil de separação. A fase aquosa é acidificada com solução de HCl 6 M e lavada três vezes com solvente orgânico. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente retirado por evaporação sob pressão.



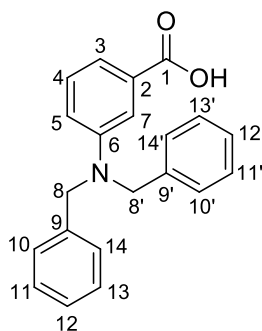
**Ácido 3-(benzil(4-hidroxibenzil)aminobenzoico (2h):** Produto obtido como um óleo amarelo em 70 % de rendimento (233 mg), pureza de 100%. RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): 7,49 - 7,21(m, 13H, H4, H5, H7, H10, H11, H13, H14, H17, H18, H19, H20, H21), 6,84 (d,  $J = 7,56$  Hz 1H, H3), 5,35 (s, 2H, H15), 4,36 (s, 2H, H8). RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): 166,7 (C1), 147,6 (C2), 138,6 (C3), 137,0 (C7), 131,1 (C4), 129,3 (C5), 128,7 (C6), 128,6 (C17, C21), 128,1 (C16), 128,1 (C18, C20), 127,7 (C10, C14), 127,5 (C11, C13), 119,3 (C9), 117,7 (C19), 114,2 (C12), 66,1 (C15) 48,9 (C8).

#### 6.3.2.1. Síntese do produto 2a

Em balão de fundo redondo adicionaram-se: 6 eq. de *meta*-aminobenzoato de metila, 2,1 eq. de cloreto de benzila e 2,2 eq. de DIPEA em 10 mL de DMF. O sistema foi vedado e mantido sob refluxo por 6 horas. O produto foi purificado por CC em técnica de gradiente com fase móvel constituída de hexano/acetato de etila. Esta síntese apresentou um subproduto ao final do consumo dos materiais de partida, a caracterização identificou esse subproduto como o composto **2a**.



**3-(dibenzilamino)benzoato de metila (éster 2a):** Produto obtido como um sólido branco fino em 95 % (314 mg), pureza de 99%. RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): 7,36 (m, 1H, H3), 7,33 (m, 1H, H7), 7,31 (m, 2H, H4, H5), 7,27 (m, 2H, H10, H14), 7,25 (m, 2H, H10' H14'), 7,22 (m, 2H, H11 H13), 7,20 (m, 2H, H11', H13'), 6,94 (m, 2H, H12, H12'), 4,74 (s, 4H, H8 e H8'), 3,75 (s, 1H, H15). RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): 166,6 (C1), 148,3 (C2, C6), 138,3 (C3, C7), 129,2 (C4), 128,4 (C5), 126,8 (C8, C8'), 126,5 (C9, C9'), 117,0 (C14, C14'), 116,9 (C10, C10'), 116,7 (C13, C13'), 112,4 (C11, C11'), 54,1 (C12, C12'), 51,9 (C15).



**Ácido 3-(dibenzilamino)benzoico (2a):** Produto obtido como um sólido branco fino, com 5 % de rendimento (15 mg), pureza de 99%. RMN  $^1\text{H}$  [300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): 7,35 – 7,18 (m, 13H, anel aromático), 6,91 (s, 1H, H4), 4,74 (s, 4H, C8, C8'). RMN  $^{13}\text{C}$  [75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ]  $\delta$  (ppm): 168,2 (C1), 148,7 (C2, C7), 139,0 (C3, C4), 131,9 (C5), 129,5 (C6), 129,0 (C8, C8'), 127,2 (C9, C9'), 127,0 (C10, C10), 117,5 (C14, C14'), 116,9 (C13, C13'), 113,2 (C11, C11'), 54,6 (C12, C12').

#### 6.4. MÉTODOS ANALÍTICOS E DE CARACTERIZAÇÃO

Durante as reações foram utilizados métodos variados para: o acompanhamento da síntese; a purificação de compostos; a determinação estrutural das substâncias obtidas e da pureza das moléculas. Os métodos escolhidos são detalhados abaixo.

#### 6.4.1. Cromatografia em camada delgada

O acompanhamento das reações ocorreu por CCD. A fase móvel foi constituída da mistura de hexano e acetato de etila em proporções 20%; 25%; 33% e 50% de acetato de etila, de acordo com a polaridade do produto em questão. As cromatofolhas poderão ser reveladas por lâmpada ultravioleta (UV), vanilina, molibdato, ninidrina e/ou iodo.

#### 6.4.2. Cromatografia em coluna

A CC foi utilizada para a purificação dos compostos obtidos, especificamente para a retirada de anilina ou éster ainda presente no meio reacional. Para a CC utilizou-se sílica gel com poros de 60 Å, 230-400 mesh, obtida comercialmente da Merck®. Para as fases móveis da CC, misturas de hexano e acetato de etila, variando em conformidade com a polaridade dos produtos a serem separados.

#### 6.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

A determinação da pureza dos compostos sintetizados foi conduzida por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se o cromatógrafo Shimadzu Proeminence®, com coluna analítica Zorbax SB-Phenyl® (5µ, 150x4,6 mm) e detecção por luz ultravioleta (UV) em 264 nm. As amostras foram preparadas com concentração de 0,25 mg/mL e volume de injeção de 10 µL. Para sistema eluente, utilizou-se uma solução de água deionizada com 0,1 % de ácido trifluoracético (TFA) (solvente A) e outra solução de acetonitrila (ACN) com 0,1 % de ácido trifluoracético (TFA) (solvente B). A análise teve início com 5 % do solvente B, chegando a 100 % após 10 minutos. A concentração do solvente B foi diminuída para 50 % após 15 minutos e gradativamente para 0 % até completar 25 minutos.

#### 6.4.4. Ressonância magnética nuclear

A determinação estrutural das substâncias obtidas realiza-se por meio de análises espectroscópicas de RMN para núcleos de <sup>13</sup>C e de <sup>1</sup>H, obtidos no espectrômetro Bruker® Advanced DPX-300, operando a 300 MHz para o núcleo de <sup>1</sup>H e 75 MHz para o núcleo de <sup>13</sup>C. Para este método os compostos foram dissolvidos em clorofórmio e dimetilsulfóxido deuterados (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) de acordo com a estrutura molecular do analito. Os deslocamentos químicos foram expressões em ppm. As abreviações utilizadas

para multiplicidade são: singleto (s), duplete (d), duplo duplete (dd) tripleto (t) e multiplete (m). A constante de acoplamento ( $J$ ) é dada em Hertz (Hz)

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAGRID, A.F.; CARSON, K. G.; HARRIS, B.D.; MARYANOFF, C.A.; SHAH, R.D. Reductive amination of aldehydes and ketones with sodium triacetoxyborohydride. Studies on direct and indirect reductive amination procedures. **Journal of Organic Chemistry**, n. 61, p. 3849-3862, 1996.

ACHARYA, R.; CHACKO, S.; BOSE, P.; LAPENNA A.; PATTANYAK, S.P. Structured based multitargeted molecular docking analysis of selected furanocoumarins against breast cancer. **Scientific Reports**, n. 9, p. 1-13, 2019.

ACHARYA, C.; COOP, A.; POLLI, J.E.; MACKERELL JR, A.D. Recent advances in ligand-based drug design: Relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore Approach. **Current Computer-Aided Drug Design**, n. 7, p. 10-22, 2011.

ADIGUN, R.; SINGH, R. Tuberculosis. **StatPearls**, 2022.

AIN, Q.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Chemotherapeutic potential of orally administered poly (lactide-co-glycoside) microparticles containing isoniazid, rifampin, and pyrazinamide against experimental tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.47, n.9, p.3005-3007, 2003.

AISO, K.; NOZAKI, T.; SHIMODA, M.; KOKUE, E. Assay of dihydrofolate reductase activity by monitoring tetrahydrofolate using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytical Biochemistry**, v.272, n.2, p.143-148, 1999.

ANDERSON, A.C. The process of structure-based drug design. **Chemistry & Biology**, v.10, p.787-797, 2003.

BARBASSA, L. Novas formulações de fármacos tuberculostáticos em dispersões de brometo de dioctadecildimetilamônio: preparação, caracterização e avaliação da atividade *in vitro* contra micobactérias. 2010. 91f. Dissertação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas. São Paulo. 2010.

BANSAL, R.; SHARMA, D.; SINGH, R. Tuberculosis and its treatment: An overview. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 58-71, 2018.

Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. **The Protein Data Bank**, c1998. Página Inicial. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/>>. Acesso em: 20 de nov de 2019.

CAMBIER, C.; FALKOW, S.; RAMAKRISHNAN, L. Host evasion and exploitation schemes of Mycobacterium tuberculosis. **Cell**, v. 159, n. 7, p. 1497-1509, 2014.

CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE. **GOLD User Guide**. United Kingdom, 2019. 220 p.

CHANG, S.Y.; CHEN, M.L.; LEE, M.R.; LIANG, Y.C.; LU, T.P.; WANG, J.Y.; YAN, B.S. SP110 Polymorphisms are genetic markers for vulnerability to latent and active tuberculosis infection in Taiwan. **Hindawi Disease Markers**. v.2018, p.1-13, 2018. Referência incompleta.

CHE LO, Y.; GUI, R.; HONDA, H.; TORRES, J.Z. Quantitative methods in system-based drug Discovery. **Complex systems, sustainability and innovation**. cap.5, p.81-97, 2016.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 1. ed. New York: Oxford University Press Inc., 2001.

COPELAND, R.A. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists**, John Wiley & Sons. p.49, 2013.

CORLEIS, B.; BUCSAN, A.N.; DERUAZ, M.; VRBANAC, V. D.; PARK, A.C.L.; GATES, S.J.; LINDER, A.H.; PAER, J.M.; OLSON, G.S. BOWMAN, B.A.; SCHIFF, A.E.; MEDOFF, B.D.; TAGER, A.M.; LUSTER, A.D.; KHADER, S.A.; KAUSHL, D.; KWON, D.S. HIV-1 and SIV infection are associated with early loss of lung interstitial CD4+ T cells and dissemination of pulmonary tuberculosis. **Cell Reports**. v.26, n.6, p.1409-1418, 2019.

DARTOIS, V.; BARRY 3<sup>rd</sup>, C.E. A medicinal chemist's guide to the unique difficulties of lead optimization for tuberculosis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.23, n.17, p.4741-4750, 2013.

DE RUYCK J.; BRYLSBAERT, G.; BLOSSEY, R.; LENSINK, M. Molecular docking as a popular tool in drug design, an *in silico* travel. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry: AABC**, v. 9, p. 1-11, 2016.

DIAS, M.V.B.; TYRAKIS, P.; DOMINGUES, R.R.; PAES LEME, A.F.; BLUNDELL, T.L. *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals two conformational states and a possible low affinity mechanism to antifolate drugs. **Structure**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 2014.

DUNCAN, K. Progress in TB drug development and what is still needed. **Tuberculosis**. v.83, p.201-207, 2003.

DUTT, M.; KHULLER, G.K. Chemotherapy of *Mycobacterium tuberculosis* infections in mice with a combination of isoniazid and rifampicin entrapped in poly (dl-lactide-co-glycolide) microparticles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.47, p.829-835, 2001.

EL-HAMAMSY, M.H.R.I.; SMITH, A.W.; THOMPSON, A.S.; THREADGILL, M.D. Structure-based design, synthesis and preliminary evaluation of selective inhibitors of dihydrofolate reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.15, p.4552-4576, 2007.

ESHETIE, S.; GIZACHEW, M.; ALEBEL, A.; SOOLINGEN, D. Tuberculosis treatment outcomes in Ethiopia from 2013 to 2016, and impact of HIV co-infection and prior drug exposure: A systematic review and meta-analysis. **Plos one**. v.3, n.13, p.1-18, 2018.

FERREIRA, L.G.; DOS SANTOS, R.N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FOGEL, N. Tuberculosis: A disease without boundaries. **Tuberculosis**, v. 95, p. 527-531, 2015.

FURIN, J.; COX, H.; PAI, M. Tuberculosis. **The Lancenet**, seminar, p. 1-15, 2019.



GIUDICE, G.H. Parâmetros de uma validação analítica: Uma revisão bibliográfica. **Acta de Ciências e Saúde**, v. 1, n. 5, p. 130-134, 2016.

GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2021. **World Health Organization**. França, 2021.

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**. v.24, n.70, p.81-98, 2010.

HALGREN, T.A. Merck Molecular Force Field. I. Basis, form, scope, parameterization and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**. v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996.

HANSEN, P.E.; KAMOUNAH, F.S.; SAEED, B.A.; MACLACHLAN, M.J.; SPANGET-LARSEN, J. Intramolecular hydrogen bonds in normal and sterically compressed *o*-hydroxy aromatic aldehydes. Isotope effects on chemical shifts and hydrogen bond strength. **Molecules**. v. 24, n. 24, p. 1-15, 2019.

HERAVI, M.M.; GHAVIDEL, M.; MOHAMMADKHANI, L. Beyond a solvent: triple roles of dimethylformamide in organic chemistry. **Royal Society of Chemistry Advances**, n. 8, p. 27832-27862, 2018.

HONG, W.; WANG, Y.; CHANG, Z.; YANG, Y.; PU, J.; SUN, T.; KAUR, S.; SACCHETTINI, J.C.; JUNG, H.; WONG, W.L.; YAP, L.F.; NGEOW, Y.F.; PATERSON, I.C.; WANG, H. The identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* DHFR inhibitors and the investigation of their binding preferences by using molecular modelling. **Scientific Reports**. n.5, p.1-14, 2015

ISMAIL, M.B.; RAFEI, R.; DABBOUSSI, F.; HAMZE, M. Tuberculosis, war and refugees: Spotlight on the Syrian humanitarian crisis. **Plos one**. v.6, n.14, p.1-6, 2018.

KAROLI, T.; BECKER, B.; ZUEGG, J.; MÖLLMANN, U.; RAMU, S.; HUANG, J.X.; COOPER, M.A. Identification of antitubercular benzothiazinone compounds by ligand-based design. **Journal of Medicinal Chemistry**. n.55, p.7940-7944, 2018.

KOZINSKA, M.; PODLASIN, R.; ROPELWESKA-LACKA, K.; WOJTYCHA-KWASNICA, B.; BAJERA-MITSCHHEIN, I.; AUGUSTYNOWICZ-KOPÉC, E. TB and COVID-19 coinfection. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 25, n. 9, p.2, 2021.

KRITSKI, A.; ANDRADE, K.B.; GALLIEZ, R.M.; MACIEL, E.L.N.; CORDEIRO-SANTOS, M.; MIRANDA, S.S.; VILLA, T.S.; NETTO, A.R.; ARAKAKI-SANCHÉZ, D.; CRODA, J. Tuberculosis: renewed challenge in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.1, n.51, p.2-6, 2018.

KRONENBERGER, T.; FERREIRA, G.M.; SOUZA, A.D.F.; SANTOS, S.S.; POSO, A.; RIBEIRO, J.A.; TAVARES, M.T.; PAVAN, F.R.; TROSSINI, G.H.G.; DIAS, M.V.B. Design, synthesis and biological activity of novel substituted 3-benzoic acid derivatives as MtDHFR inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 15, p. 115600–115610, 2020.

KUROSU, M.; DEY, S.S.; CRICK, D.C. Efficient synthesis of tertiary amines from secondary amines. **Tetrahedron Letters**, n. 47, p. 4871-4875, 2006.

LAMICHHANE, G. Novel targets in *M. tuberculosis*: Search for new drugs. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 1, p. 25-33, 2011.

LELE, A.C.; KAHMBETE, M.P.; RAJU, A; RAY, M. RAJAN, M.G.R.; DEGANI, M.S. Design and synthesis of novel *Mycobacterium tuberculosis* DHFR inhibitors. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v.7, n.6. p.2352-2356, 2016.

LELE, A.C.; RAJU, A; KAHMBETE, M.P.; RAY, M.K.; RAJAN, M.G.R.; ARKILE, M.A.; JADHAV, N.J.; SAKAR, D.; DEGANI, M.S. Design and synthesis of a focused library of diamino triazines as potential *Mycobacterium tuberculosis* DHFR inhibitors. **ACS Medicinal Chemistry Letters**. n.6, p.1140-1141, 2015.

LI, R.; SIRAWARAPORN, R.; CHITNUMSUB, P.; SIRAWARAPORN, W.; WOODEN, J.; ATHAPPILLY, F.; TURLEY, S.; HOL, W.G.J. Three-dimensional structure of *M. tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. **Journal of Molecular Biology**. v.295, p.307-323, 2000.

LIE, M.A.; THOMSEN, R.; PEDERSEN, C.N.S.; SCHIOTT, B.; CHRISTENSEN, M.H. Molecular docking with ligand attached water molecules. **Journal of Chemical Information and Modeling**. n. 51, p. 909-917, 2011.

LINK, J.T.; SORENSEN, B.K.; PATEL, J.; EMERY, M.; GRYNFARB, M.; GOOS-NILSSON, A. Discovery of novel nonsteroidal glucocorticoid receptor modulators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, n. 14, p. 2209-2212, 2004.

LIONTA, E.; SPYROU, G.; VASSILATIS, D. K.; COUMIA, Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: Principles, applications and recent advances. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1923, 2014.

MANOS-TURVEY, A.; WATSON, E. E.; SYKES, M. L.; JONES, A. K.; BAELL, J. B.; KAISER, M.; PAYNE, R. J. Synthesis and evaluation of phenoxyethylbenzamide analogues as anti-trypanosomal agents. **MedChemComm Journal**, v. 6, n. 3, p. 403-406, 2015.

MCALLISTER, M.I.; BOULHO, C.; MCMILLAN, L.; GILPIN, L.F.; BRENNAN, C; LENNON, D. The hydrogenation of mandelonitrile over a Pd/C catalyst: Towards a mechanistic understanding. **Royal Society of Chemistry Advances**, n. 45, p. 26116-26125, 2019.

MCQUAID, C.F.; VASSALL, A.; COHEN, T.; FIEKERT, K.; WHITE, R.G. The impact of COVID-19 on TB: a review of the data. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**. v. 25, n. 6, p. 436-446, 2021.

MENG, X., ZHANG, H.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.

MIKAMI, S.; KITAMURA, S.; NEGORO, N.; SASAKI, S. SUZUKI, M.; TSUJIHATA, Y.; MIYAZAKI, T.; ITO, R.; SUZUKI, N.; MIYAZAKI, J.; SANTOU, T.; KANZAKI, N.; FUNAMI, M.; TANAKA, T.; YASUMA, T.; MOMOSE, Y. Discovery of phenylpropanoic acid derivatives containing polar functionalities as potent and orally bioavailable G protein-coupled receptor 40 agonists for the treatment of type 2 Diabetes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.55, p. 3756-3776, 2012.

OLENDER, D.; ZWAWIAK, J.; ZAPRUTKO, L. Multidirectional efficacy of biologically active nitro compounds included in medicines. *Pharmaceuticals*, v. 11, n. 54, p. 1-29, 2018.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, n.8, p.2720-2722, 2002.

PALUCCI, I.; DELOGU, G. Host directed therapies for tuberculosis: Futures strategies for an ancient disease. *Chemotherapy*. v.63, p.172-180, 2018.

PANDLEY, R.; ZAHOR, S. S.; KHULLER, G.K. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis*. v.83, p.373-378, 2003.

PARHAM, W.E.; ANDERSON, E.L. The protection of hydroxyl groups. *Journal of American Chemistry Society*. v. 12, n. 70, p. 4187-4189, 1948.

PATIL, K.; BAGADE, S.; BONDE, S.; SHARMA, S.; SARAOGI, G. Recent therapeutic approaches for the management of tuberculosis: Challenges and opportunities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v.99, p.735-745, 2018.

PICCIRILLO, E. AMARAL, A.T. Busca virtual de compostos bioativos: Conceitos e aplicações. *Química Nova*. v. 41, n. 6, p. 662-677, 2018.

PRASAD, R. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): Problems and solutions. *The Indian Journal of Tuberculosis*. v. 57, n. 4, p. 180-191, 2011.

PRIMI, M.C. Candidatos a novos agentes tuberculostáticos: planejamento e síntese de inibidores da fosfopanteteína adenililtransferase. 2018. 89 f. Tese – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. São Paulo. 2018.

QUAGLIO, G.L.; PIZZOL, D.; BORTOLANI, A.; MANENTI, F.; ISAAKIDIS, P.; PUTOTO, G.; OLLIARO, P.L. Breast tuberculosis in men: A systematic review. *Plos one*. v.4, n.13, p.1-11, 2018.

RIBEIRO, J.A.; CHAVEZ-PACHECO, S.M.; OLIVEIRA, G.S.; SILVA, C.S.; GIUDICE, J.H.P.; LIBREROS-ZÚÑIGA, G.A.; DIAS, M.V.B. Crystal structures of the closed form of *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase in complex with dihydrofolate and antifolates. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, v. 75, p. 682–693, 2019.

RIMET, O.; CHAUVET, M.; BRIAND, B. A novel fluorometric assay for quantitative analysis of dihydrofolate reductase activity in biological samples. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v.14, n.6, p.335-342, 1987.

RIYADH, S.M.; EL-MOTAIRI, S.A.; AHMED, H.E.A.; KALIL, K.D.; HABIB, E.E. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking of novel thiazoles and [1,3,4]thiazoles incorporating sulfonamide group as DHFR inhibitors. *Chemistry & Biodiversity*. n.15, p.1-15, 2018.

ROBERTS, B.C.; MANCERA, R.L. Ligand-Protein docking with water molecules. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 2, p. 397-408, 2008.

SATTA, G.; LIPMAN, M.; SMITH, G.P.; ARNOLD, C.; KON, O.M.; MCHUGH, T.D. *Mycobacterium tuberculosis* and whole-genome sequencing: How close are we to unleashing its full potential?. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 24, n. 6, p. 604-609, 2017.

SEGRETTI, N.D. Planejamento e síntese de tuberculostáticos potenciais com base na estrutura de maltosiltransferase (*GigE*) de *Mycobacterium tuberculosis*. 2016. 336f. Tese – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. São Paulo. 2016.

SETH S.K. Structural elucidation and contribution of intermolecular interactions in *o*-hydroxy acyl aromatics: insights from x-ray and Hirshfeld surface analysis. **Journal of Molecular Structure**. v. 1064, p. 70-75, 2014.

SHARMA, K.; TANWAR, O.; DEORA, G.S.; ALI, S.; ALAM, M.M.; ZAMAN, M.S.; KRISHNA, V.S.; SRIRAM, D.; AKHTER, M. Expansion of a novel lead targeting *M. tuberculosis* DHFR as antitubercular agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. n.XX, p.XXX-XXX, 2019.

SHARMA, K.; TANWAR, O.; SHARMA, S.; ALI, S.; ALAM, M.M.; ZAMAN, M.S.; AKHTER, M. Structural comparison of Mtb-DHFR and h-DHFR for design, synthesis and evaluation of selective non-pteridine analogues as antitubercular agents. **Bioorganic Chemistry**. n.80, p.319-333, 2018.

SILVA, R.E.; AMATO, A.A.; GUILHEM, D.B.; CARVALHO, M.R.; NOVAES, M.R.C.G. International Clinical Trials in latin american and caribbean countries: Research and development to meet local health needs. **Frontiers in Pharmacology**. v.8, p.1-8, 2017.

SINGH, R.; DWIVEDI, S.P.; GAHARWAR, U.S.; MEENA, R.; RAJAMANI, P.; PRASAD, T. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 128, n. 6, p. 1547-1567, 2019.

SLATER, J.C. A simplification of the Hartree-Fock method. **Physical Review**, v. 81, n. 3, p. 385-390, 1951.

SOUZA, A.D.F. Otimização de novos inibidores da di-idrofolato redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (*MtDHFR*): *Docking* molecular, síntese, avaliação da inibição enzimática e da atividade antimicobacteriana.2018. 126f. Dissertação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo. 2018.

STEWART, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173-1213, 2007

STEWART, J.J.P. Application of the PM6 method to modeling proteins. **Journal of Molecular Modeling**, v. 15, n. 1, p. 765-805, 2009

TAWARI, N.R.; BAG, S. DEGANI, M.S. A review of molecular modelling studies of dihydrofolate reductase inhibitors against opportunistic microorganisms and comprehensive evaluation of new models. **Current Pharmaceutical Design**. v.17, n.7, p.712-751, 2011.

TAWARI, N.R.; BAG, S.; RAJU, A.; LELE, A.C.; BAIRWA, R.; RAY, M.K.; RAJAN, M.G.R.; NAWALE, L.U.; SARKAR, D.; DEGANI, M.S.; Rational drug design, synthesis and biological evaluation of dihydrofolate reductase inhibitors as antituberculosis agents. **Future Medical Chemistry**. v.7, p.979-988, 2015.

TEO, A.K.J.; ONG, C.W.M., HSU, L.Y. COVID-19 and TB: a progression-regression conundrum. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**. v. 25, n. 6, p. 421-423, 2021.

VASAVA, M.S.; BHOI, M.N.; RATHWA, S.K.; BORAD, NAIR, S.G.; PATEL, H.D. Drug development against tuberculosis: Past, present and future. **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 64, n. 4, p. 252-275, 2017.

VASSILIADES, S. V.; NAVARAUSCKAS, V. B.; DIAS, M. V. B.; PARISE-FILHO, R. *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase inhibitors: State of art past 20 years. **Biointerface Research in Applied Chemistry**,v. 12, n. XX, 2022.

YAMEY, G. The world's most neglected diseases ignored by the pharmaceutical industry and by public-private partnerships. **BMJ**.v.325, p.176-177, 2002.

YANG, X.; WEDAJO, W.; YAMADA, Y.; DAHLROTH, S.L.; NEO, J.J.L.; DICK, T.; CHUI, W.K. 1,2,3-triazaspiro[5.5]undeca-2,4-dienes as selective *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase inhibitors with potent whole cell activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.144, p.262-276, 2018.

YANG, R.; TAVARES, M.T.; TEIXEIRA, S.F.; AZEVEDO, R.A.; PIETRO, D.C.; FERNANDES, T.B.; FERREIRA, A.K.; TROSSINI, G.H.G.; BARBUTO, J.A.M. PARISE-FILHO, R. Toward chelerythrine optimization: Analogues designed by molecular simplification exhibit selective growth inhibition in non-small-cell lung cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. n.24, p.4600-4610, 2016.

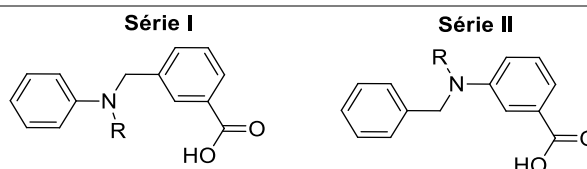
## Anexos

### ANEXO I: TABELAS

#### Tabelas de ranqueamento na ancoragem molecular dos compostos

**Tabela 1:** Séries 1e 2 ordenadas de acordo com o valor médio de ranqueamento.

Molécula	R	Ranqueamento
<b>2h</b>	<i>p</i> -hidroxibenzil	65,13
<b>1i</b>	<i>N</i> -etilmorfolinil	64,91
<b>1e</b>	<i>m</i> -metilpiridil	64,5
<b>2l</b>	acetilamino	64,21
<b>1l</b>	acetilamino	64,18
<b>1k</b>	benzenossulfonil	64,12
<b>1h</b>	<i>p</i> -hidroxibenzil	63,99
<b>1g</b>	<i>m</i> -hidroxibenzil	62,92
<b>1b</b>	etilfenil	62,91
<b>1c</b>	1-metilpiridil	62,86
<b>2i</b>	<i>N</i> -etilmorfolinil	62,12
<b>2g</b>	<i>m</i> -hidroxibenzil	61,95
<b>2j</b>	benzoíl	61,51
<b>1j</b>	benzoíl	61,32
<b>1f</b>	<i>o</i> -hidroxibenzil	61,3
<b>2b</b>	etilfenil	61,3
<b>2f</b>	<i>o</i> -hidroxibenzil	60,95
<b>2k</b>	benzenossulfonil	60,95
<b>1<sup>a</sup></b>	benzil	60,35
<b>2c</b>	1-metilpiridil	60,21
<b>2d</b>	<i>o</i> -metilpiridil	60,19
<b>1d</b>	<i>o</i> -metilpiridil	59,88
<b>2<sup>a</sup></b>	benzil	59,84
<b>2e</b>	<i>m</i> -metilpiridil	59,5



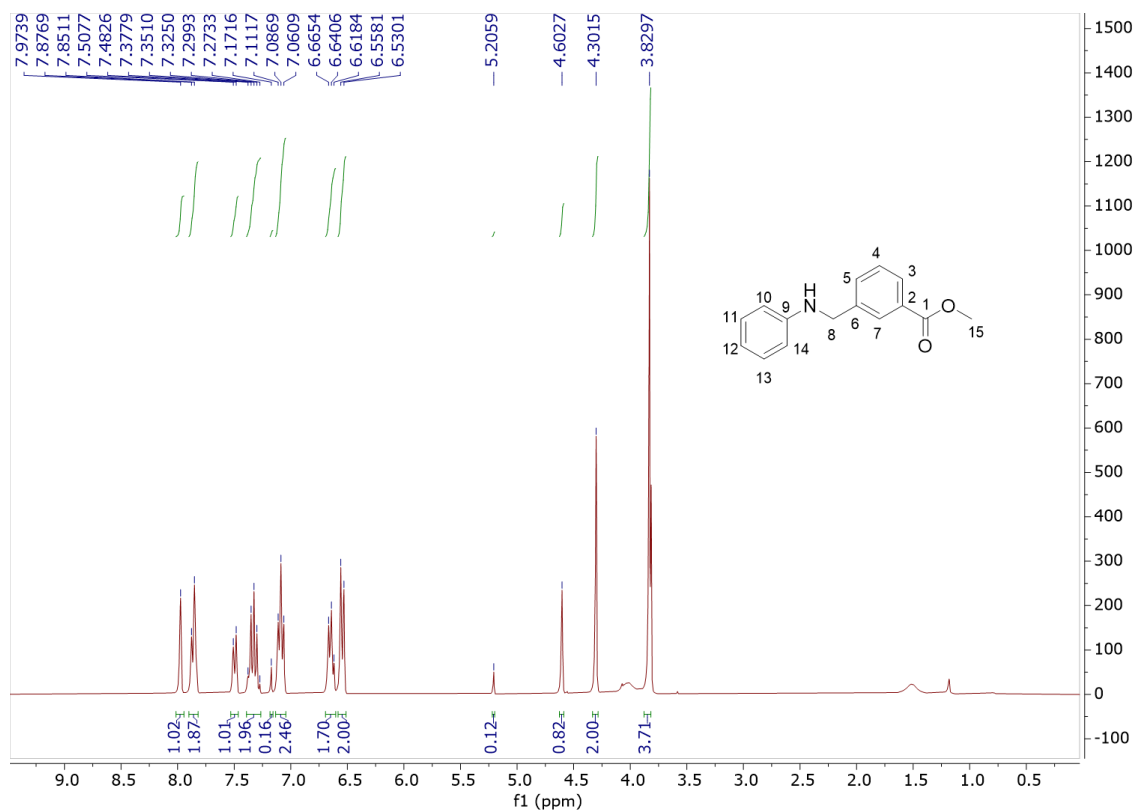
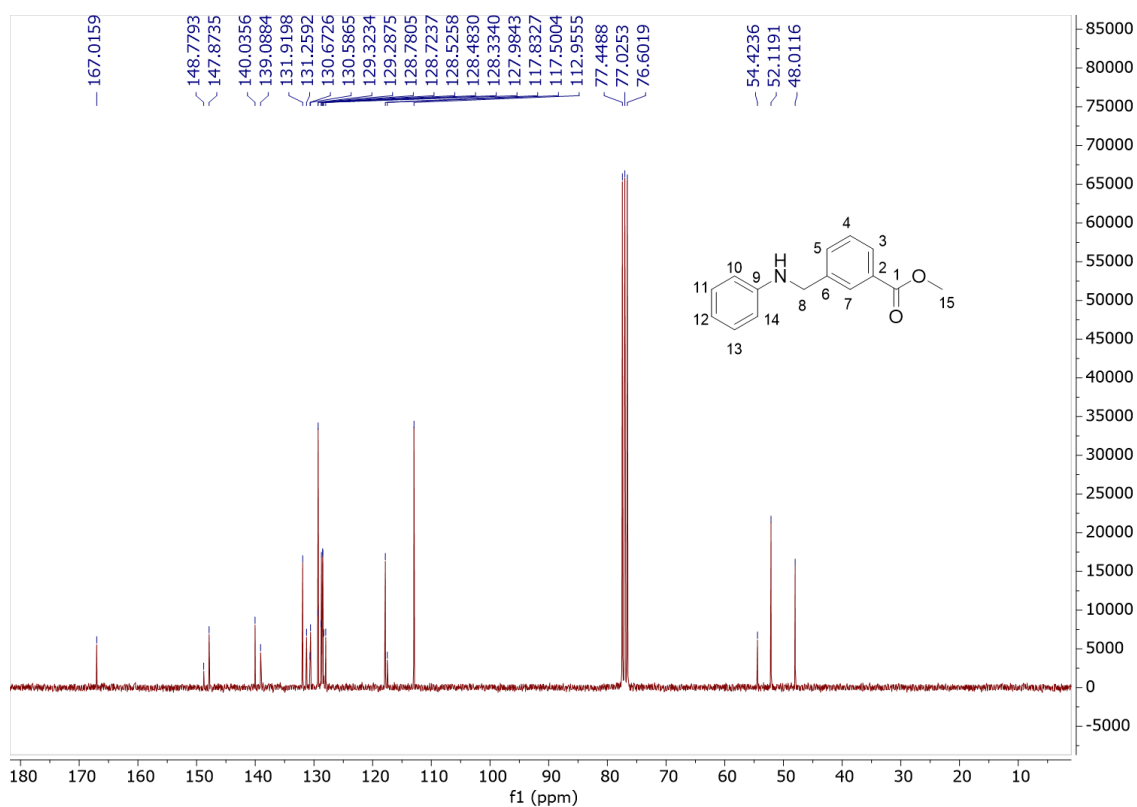
**Tabela 2:** moléculas das séries 3 e 4 ordenadas de acordo com a média do ranqueamento.

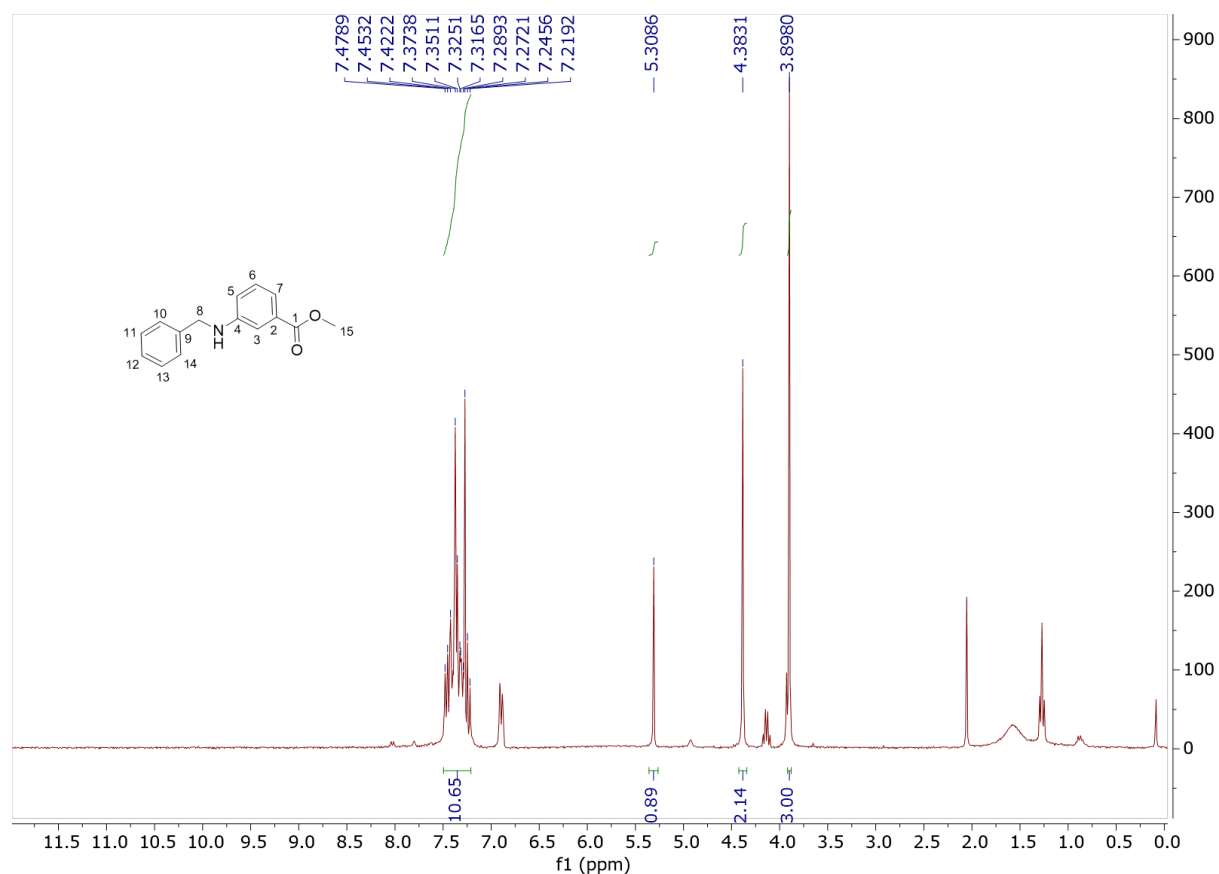
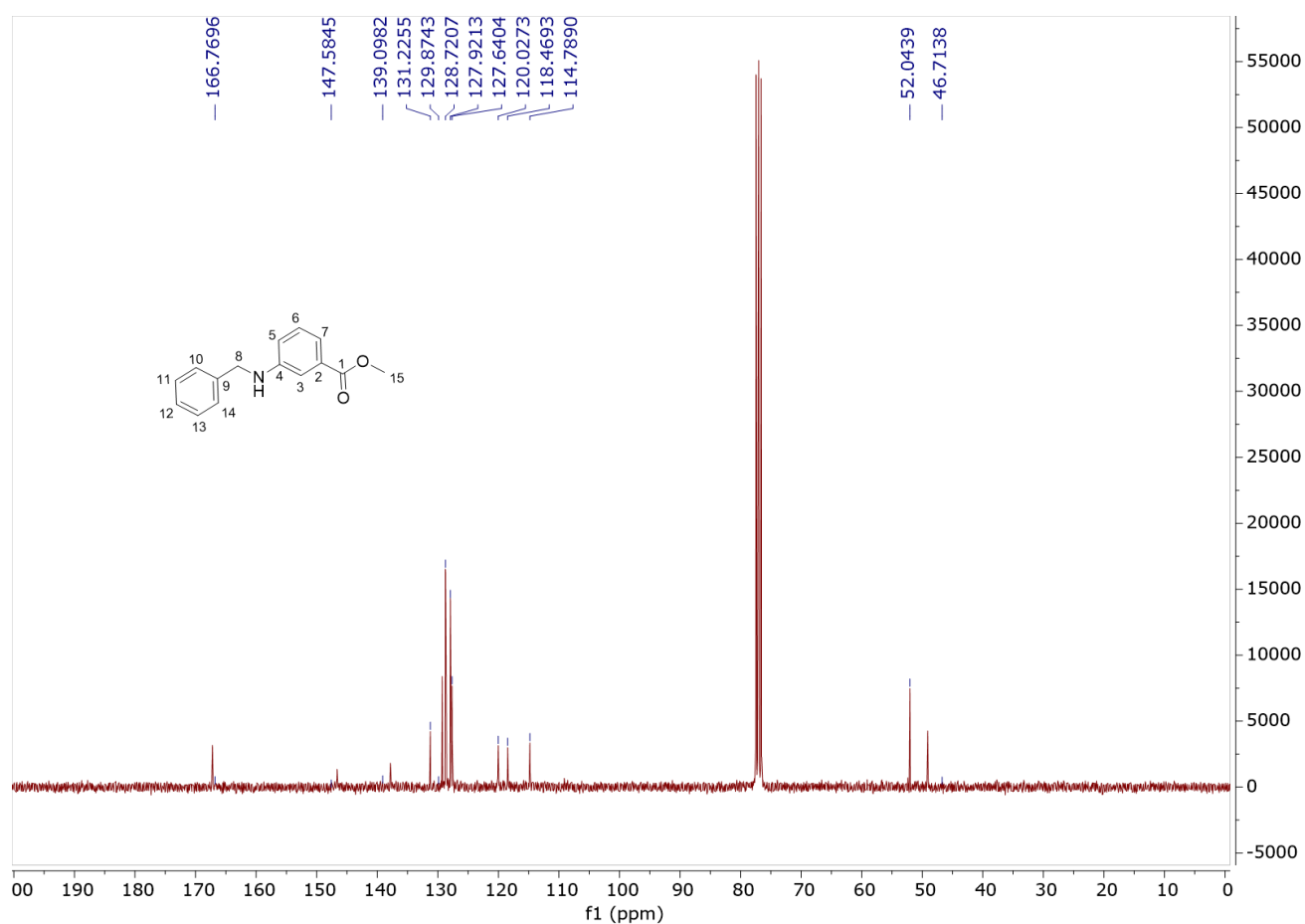

Molécula	R <sub>1</sub>	n	Escore
3x	<i>m</i> -nitrofenil	3	69,02
4x	<i>m</i> -nitrofenil	4	65,29
4w	<i>o</i> -nitrofenil	4	64,07
3t	<i>o</i> -etinilfenil	3	63,89
3u	<i>m</i> -cianofenil	3	63,59
4z	<i>p</i> -metilpiridil	4	63,4
3w	<i>o</i> -nitrofenil	3	62,97
4s	<i>m</i> -etinilfenil	4	62,73
4t	<i>o</i> -etinifenil	4	62,71
4m	fenil- <i>m</i> -ácido carboxílico	4	62,53
3s	<i>m</i> -etinilfenil	3	62,44
4v	<i>o</i> -cianofenil	4	62,39
3m	fenil- <i>m</i> -ácido carboxílico	3	62,15
3z	<i>p</i> -metilpiridil	3	62,11
4r	<i>o</i> -ácido fenilborônico	4	61,95
4u	<i>m</i> -cianofenil	4	61,66
3q	<i>m</i> -ácido fenilborônico	3	60,74
3p	3-piridil	3	60,14
3 <sup>o</sup>	2-piridil	3	60,09
4q	<i>m</i> -ácido fenilborônico	4	60,02
4ac	<i>p</i> -hidroxibenzil	4	59,93
4 <sup>o</sup>	2-piridil	4	59,88
4p	3-piridil	4	59,66
4y	2-piridin-1-ol	4	59,55
3y	2-piridin-1-ol	3	59,26
4n	1-piridil	4	59,26
3v	<i>o</i> -cianofenil	3	59,18
4ae	metiliazol	4	58,99

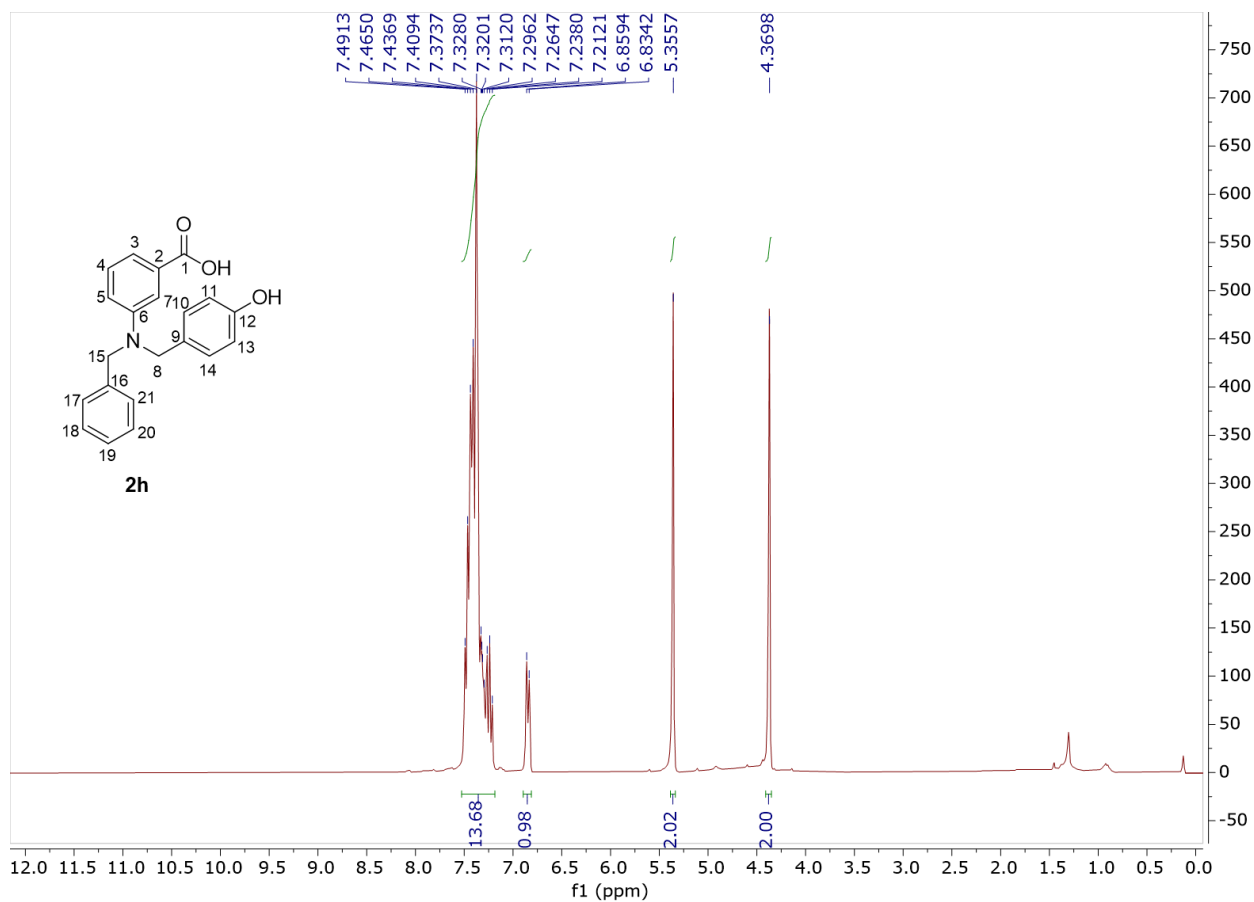
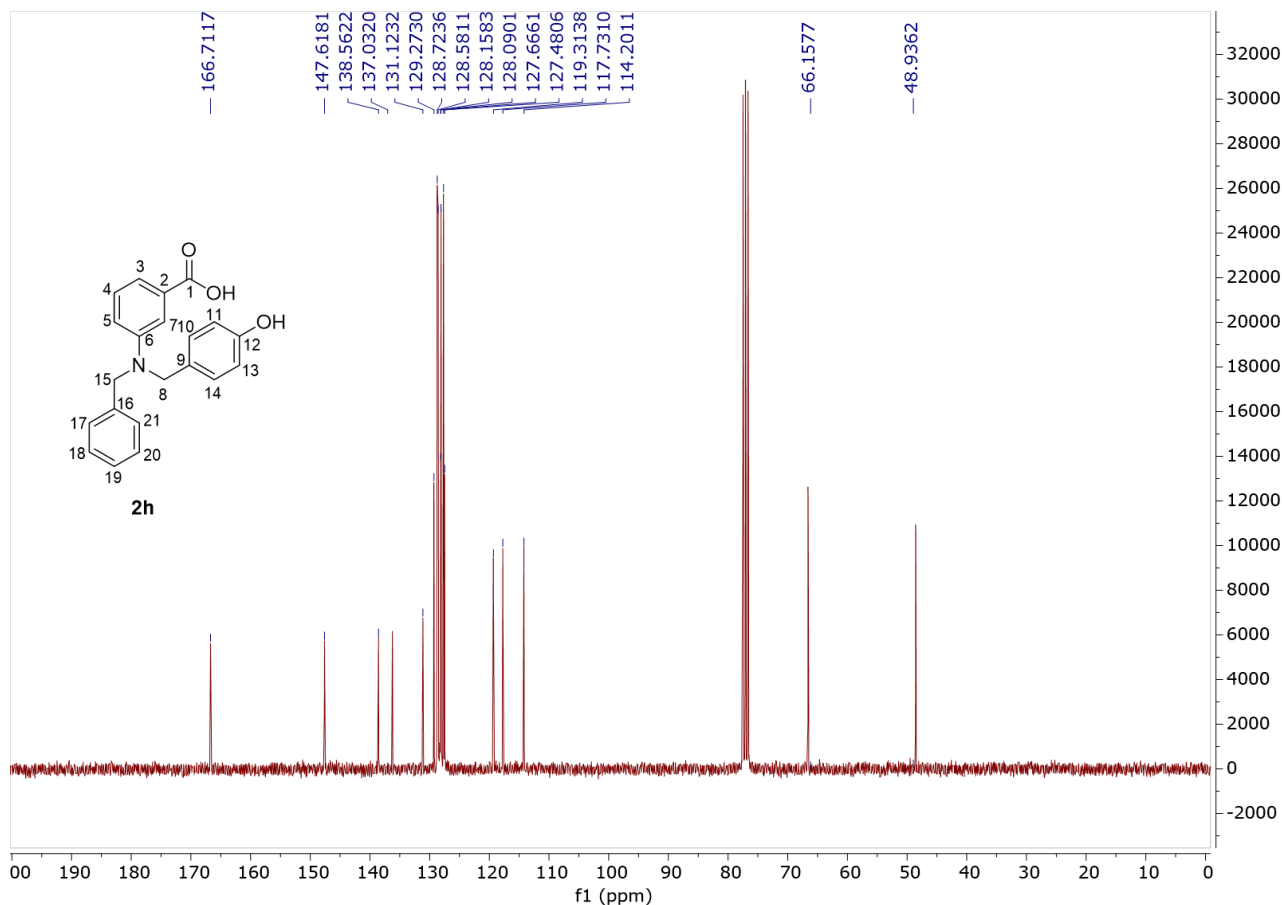
3r	<i>o</i> -ácido fenilborônico	3	58,87
4ab	<i>m</i> -hidroxibenzil	4	57,91
3ae	metiltiazol	3	57,48
4af	metiltiofeno	4	57,34
3ac	<i>p</i> -hidroxibenzil	3	57,29
3ad	<i>o,m,p</i> -hidroxibenzil	3	56,9
4ad	<i>o,m,p</i> -hidroxibenzil	4	56,77
3n	<i>o</i> -hidroxibenzil	3	56,75
3ac	<i>m</i> -hidroxibenzil	3	56,56
3aa	<i>o</i> -hidroxibenzil	3	56,21
3af	metiltiofeno	3	55,56
4aa	1-piridil	4	55,18

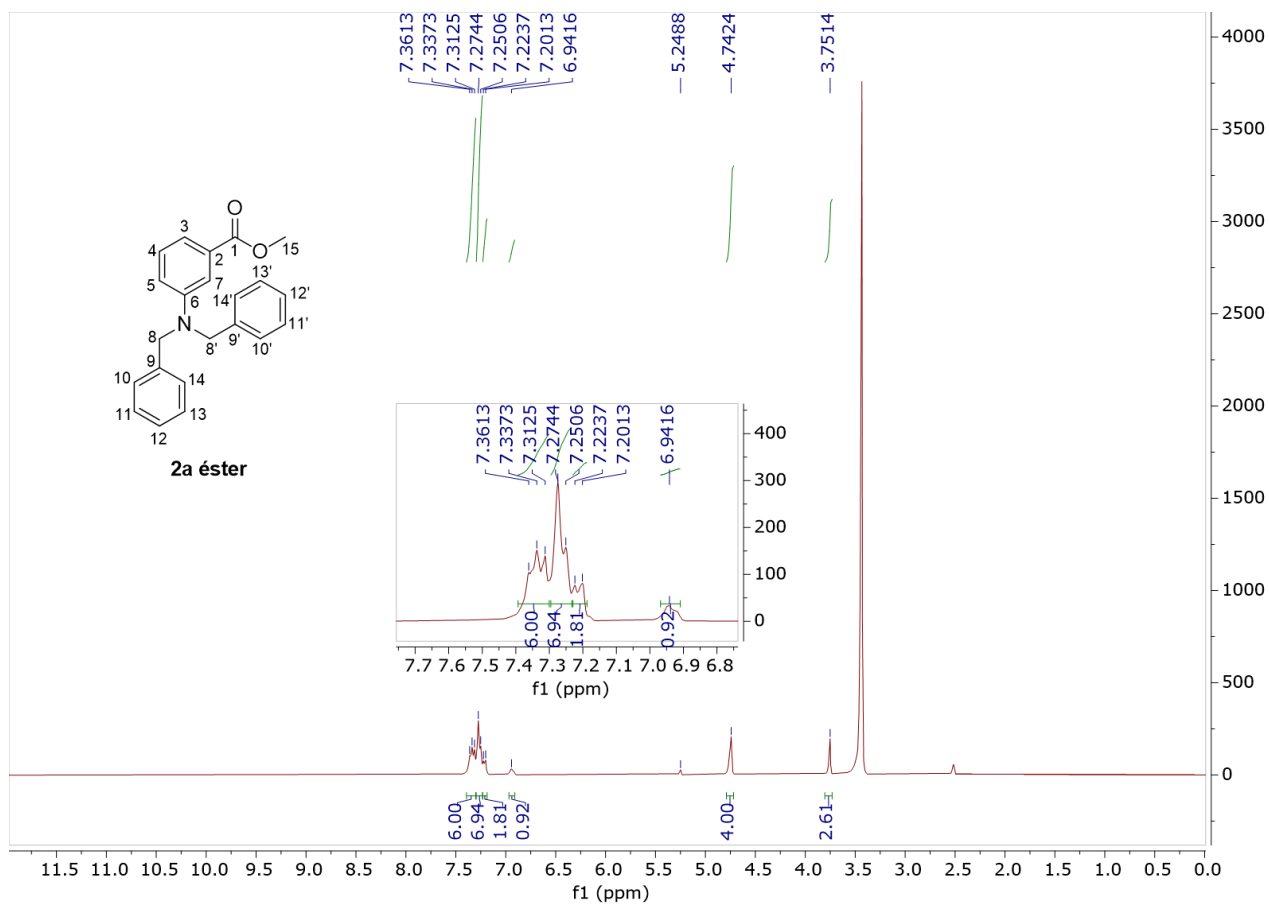
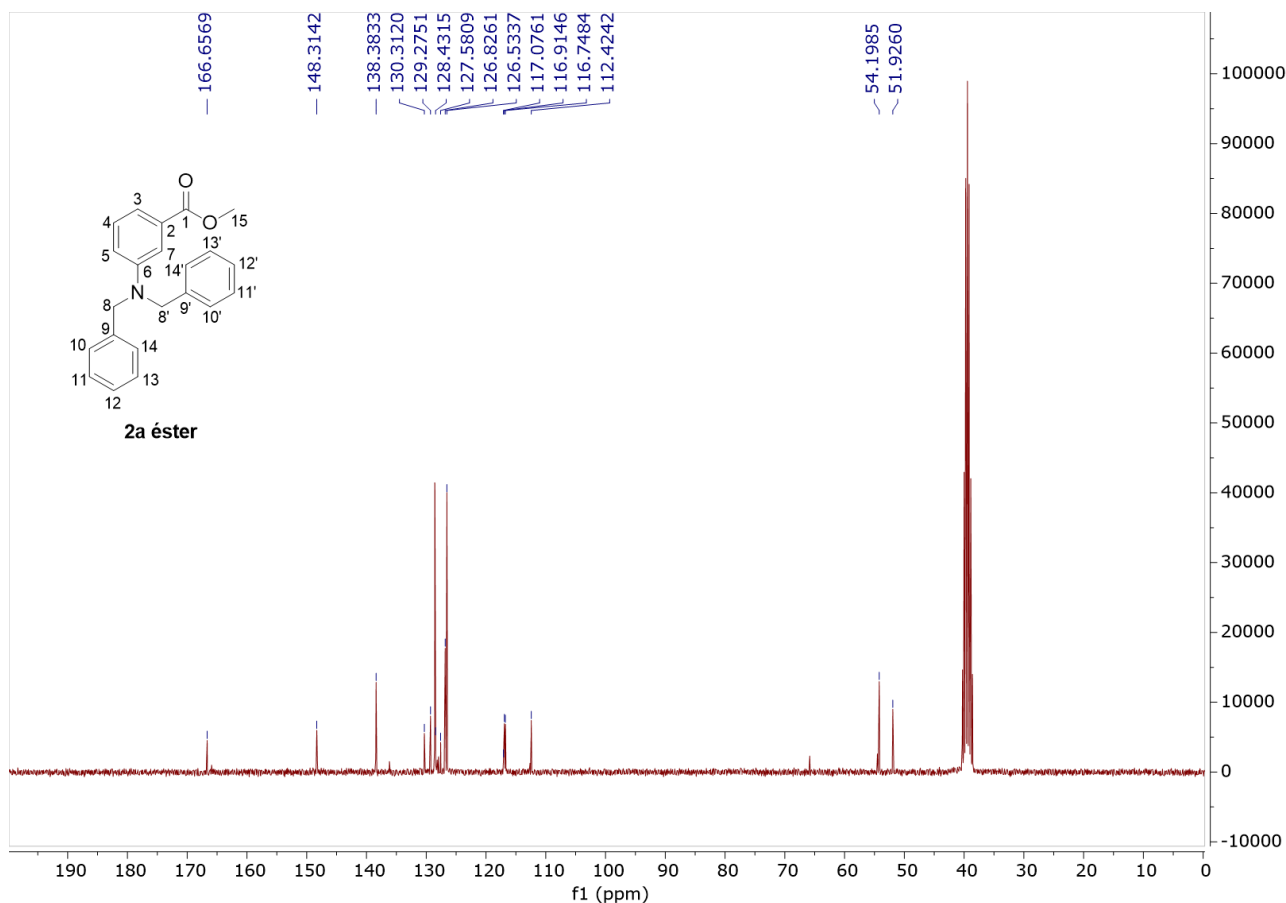


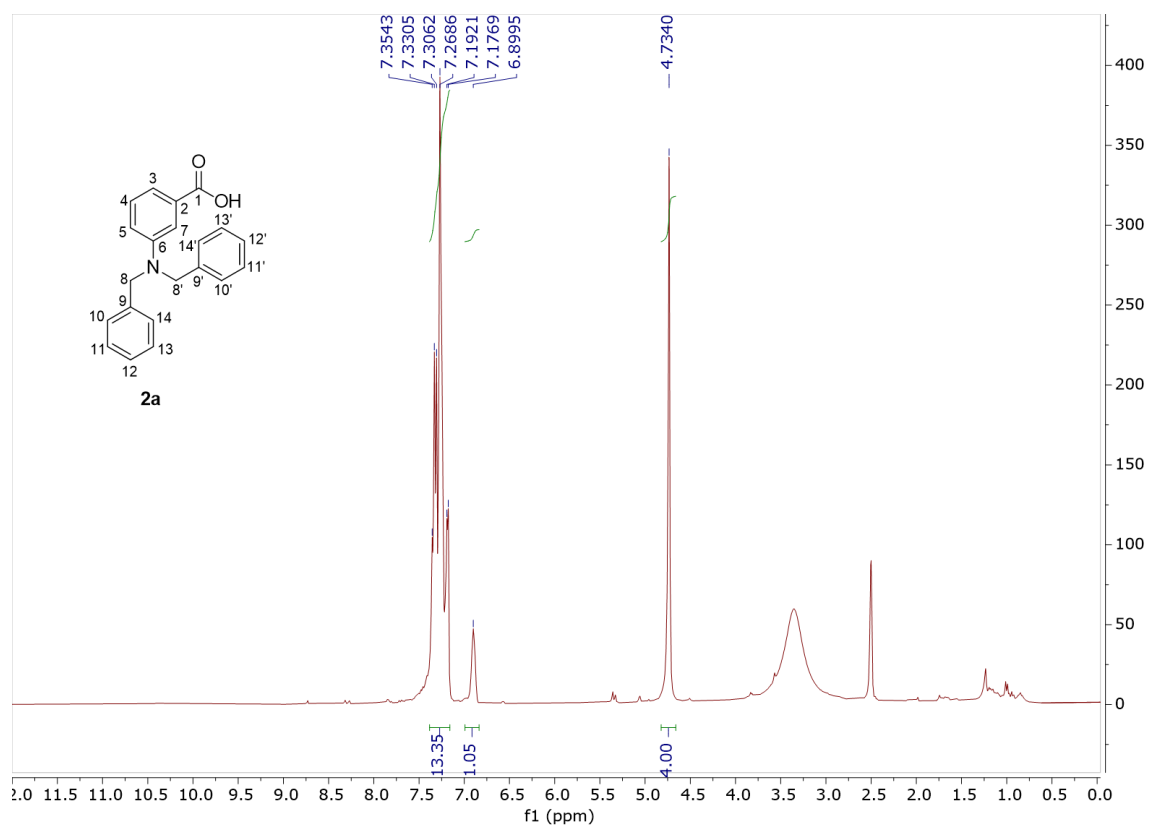
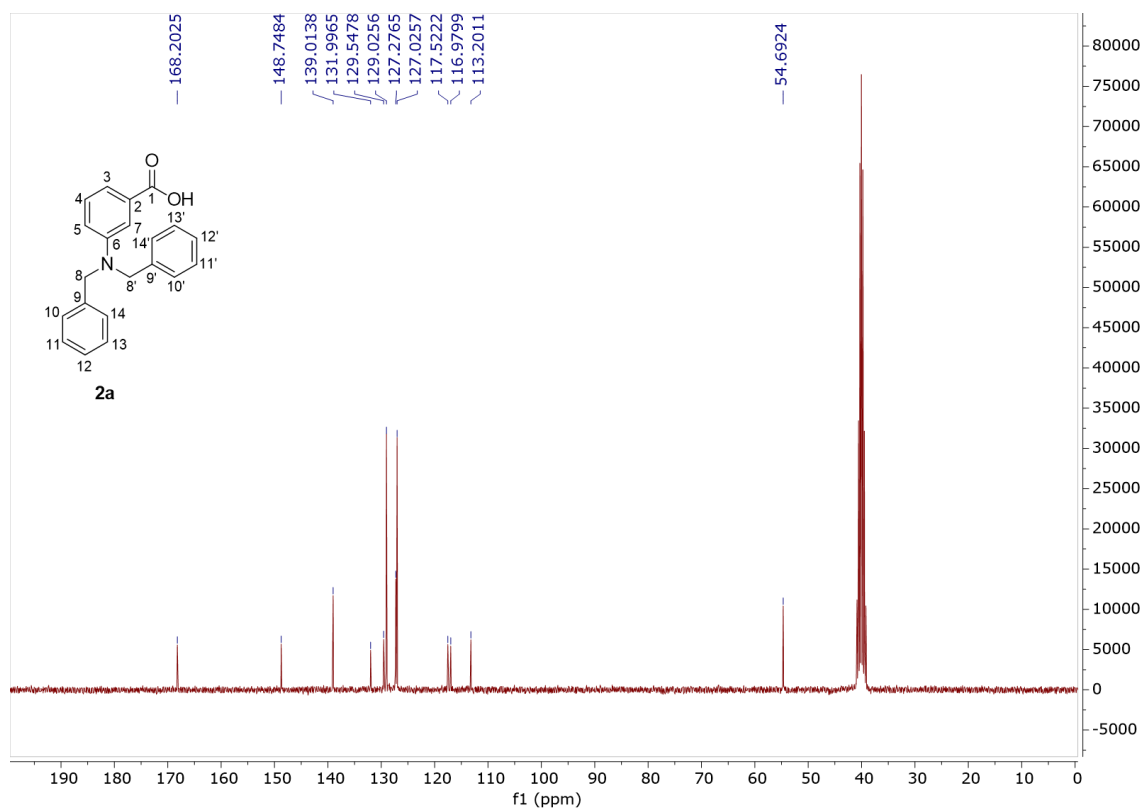
## ANEXO II: ESPECTROS DE RMN

ESPECTROS DE RMN<sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H DOS COMPOSTOS OBTIDOSEspectro de RMN <sup>1</sup>H do composto 31 (CDCl<sub>3</sub>).Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto 31 (CDCl<sub>3</sub>)

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **33** (CDCl<sub>3</sub>).Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **33** (CDCl<sub>3</sub>).

Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto **2h** (CDCl<sub>3</sub>).Espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto **2h** (CDCl<sub>3</sub>)

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do éster **2a** (DMSO- $d_6$ ).Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do éster **2a** (DMSO- $d_6$ ).

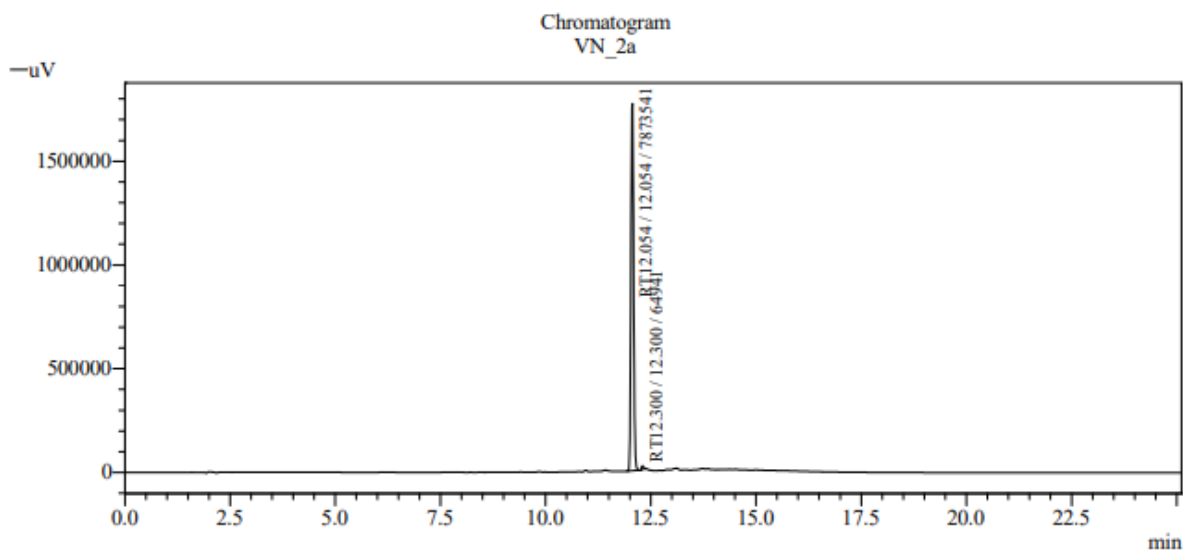
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **2a** (DMSO- $d_6$ ).Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **2a** (DMSO- $d_6$ )

## ANEXO III: CROMATOGRAMAS DE PUREZA

## ==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Vitor\Teste\VN\_2a.lcd

Acquired by : Admin  
 Sample Name : VN\_2a  
 Sample ID : VN\_2a  
 Vail # : 12  
 Injection Volume : 10 uL  
 Data File Name : VN\_2a.lcd  
 Method File Name : Agua+TFA 0,1\_ACN+TFA 0,1-25min.lcm  
 Batch File Name :  
 Report File Name : relat-Denise.lcr  
 Data Acquired : 10/1/2022 21:05:32  
 Data Processed : 17/1/2022 09:20:21



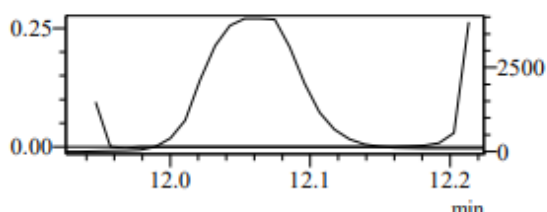
PeakTable

PDA Ch1 264nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	12.054	7873541	1768983	99.182	99.044
2	12.300	64941	17084	0.818	0.956
Total		7938482	1786066	100.000	100.000

Purity

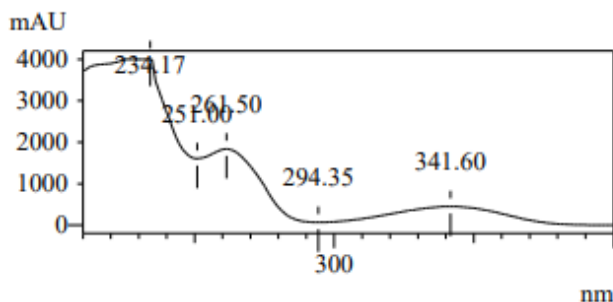
ID# : 1  
 Retention Time : 12.054  
 Compound Name : RT12.054



Impurity : Detected at 11.97 min  
 Peak purity index : 0.990107  
 Single point threshold : 0.992420  
 Minimum peak purity index : -2312

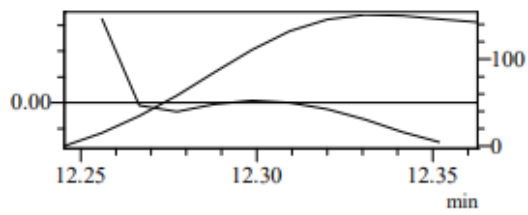
Spectrum

ID# : 1  
 Retention Time : 12.054  
 Compound Name : RT12.054  
 Spectrum Operation : None



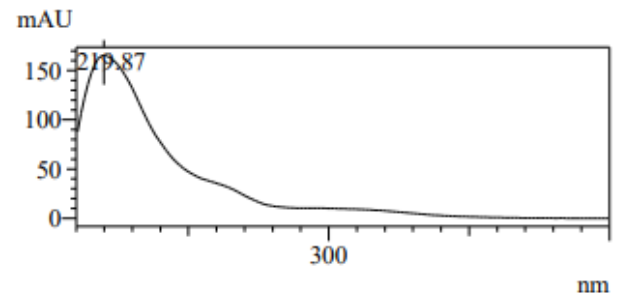
nm

ID# : 2  
Retention Time : 12.300  
Compound Name : RT12.300



Impurity : Detected at 12.35 min  
Peak purity index : 0.981278  
Single point threshold : 0.996651  
Minimum peak purity index : -15372

ID# : 2  
Retention Time : 12.300  
Compound Name : RT12.300  
Spectrum Operation : None



## ANEXO IV: CURRÍCULO LATTES

**DISCIPLINAS CURSADAS NO SEMESTRE**

NOME DA DISCIPLINA	CÓDIGO	PERÍODO	Nº DE CRÉDITOS	CONCEITO
Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	FBF5805-2/7	28/08/2019 a 20/10/2019	6	A
Tópicos Gerais de Fármacos e Medicamentos	FBF5777-4/3	05/03/2020 a 18/06/2020	3	A
A Formação do Professor Universitário (Faculdade de Educação – Universidade de São Paulo)	EDM5100-3/4	10/03/2020 a 15/06/2020	8	A
Fundamentos da Química Orgânica (Instituto de Química – Universidade de São Paulo)	QFL5933-12/3	17/03/2020 a 26/06/2020	10	A
Total de Créditos exigidos		25		
Total de Créditos cursados até o momento		27		

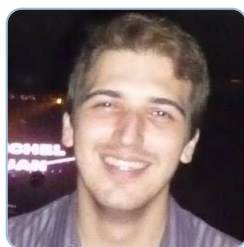
**ATIVIDADES ACADÊMICAS REALIZADAS NO PERÍODO****Programa de Aperfeiçoamento de Ensino**

- Aprimoramento didático na disciplina de Doenças Neurológicas e Psiquiátricas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Período: fevereiro de 2021 a julho de 2021.

**Artigos científicos aceitos**

VASSILIADES, S. V.; NAVARAUSCKAS, V. B.; DIAS, M. V. B.; PARISE-FILHO, R. *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase inhibitors: State of art past 20 years. ***Biointerface Research in Applied Chemistry***, v. 13, n. 1, 2022.





## Vitor de Bastos Navarousckas

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2953865367367602>

ID Lattes: **2953865367367602**

Última atualização do currículo em 25/12/2019

Possui graduação em Farmácia pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (2010). Especialização em Hematologia e Hemoterapia laboratorial pelo Instituto de Pesquisa e Ensino em Saúde de São Paulo. Especialização em Assuntos Regulatórios no Âmbito da Anvisa pelo Instituto Racine. Tem experiência na área de Farmácia nos ramos de dispensação, laboratório, indústria e docência. Atualmente é mestrando em Química Farmacêutica trabalhando com inibidores de Diidrofolato Redutase de M.tuberculosis. **(Texto informado pelo autor)**

## Identificação

<b>Nome</b>	Vitor de Bastos Navarousckas
<b>Nome em citações bibliográficas</b>	NAVAROUSCKAS, V. B.
<b>Lattes iD</b>	<a href="http://lattes.cnpq.br/2953865367367602">http://lattes.cnpq.br/2953865367367602</a>

## Endereço

## Formação acadêmica/titulação

<b>2019</b>	Mestrado em andamento em Fármacos e Medicamentos (Conceito CAPES 4). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Orientador:  Roberto Parise Filho. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
<b>2015 - 2016</b>	Especialização em Assuntos regulatórios no âmbito da ANVISA. (Carga Horária: 420h). Instituto Racine, RACINE, Brasil. Título: implicações legais e o impacto sanitário do uso de materiais para saúde não regulamentados pela ANVISA. Orientador: Marisa Tiyoko Nagao.
<b>2012 - 2014</b>	Especialização em Hematologia e Hemoterapia Laboratorial. Instituto de Pesquisa e Educação em Saúde de São Paulo, IPESP, Brasil. Título: SUBSTITUTOS PARA O SANGUE HUMANO: UMA REVISÃO DO ATUAL DESENVOLVIMENTO E DIFICULDADES EXISTENTES.
<b>2006 - 2010</b>	Graduação em Farmácia. Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Brasil. Título: Avaliação da atividade antioxidante de análogo de sesamina. Orientador: Roberto Parise Filho. Bolsista do(a): .

## Formação Complementar

<b>2007 - 2007</b>	Coleta de Sangue a Vácuo. (Carga horária: 4h). Greiner Bio-one Brasil, GREINERBB, Brasil.
<b>2006 - 2006</b>	Aplicação de Injetáveis. (Carga horária: 8h). Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Brasil.

## Atuação Profissional

Drogaria Jardim Palmira, DROGPALMIRA, Brasil.

**Vínculo institucional**

**2013 - 2014**

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Farmacêutico Responsável, Carga horária: 44, Regime: Dedicção exclusiva.

#### Colégio Técnico INACI, INACI, Brasil.

##### Vínculo institucional

2013 - 2014

##### Outras informações

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Docente, Carga horária: 56  
Ministrando aulas para os cursos Técnicos em Farmácia; Análises Clínicas; Enfermagem e Segurança do Trabalho

#### Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, Brasil.

##### Vínculo institucional

2009 - 2013

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Técnico de Laboratório, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

#### Faculdade Método de São Paulo, FAMESP, Brasil.

##### Vínculo institucional

2016 - Atual

Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Contratado, Carga horária: 16

#### Sterifarma Produtos Cirurgicos, STERIFARMA, Brasil.

##### Vínculo institucional

2014 - 2016

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Farmacêutico Responsável, Carga horária: 44

## Áreas de atuação

---

1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia.

## Idiomas

---

##### Inglês

Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

##### Espanhol

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

## Produções

---

### Produção bibliográfica

## Eventos

---

### Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. XVI Congresso Paulista de Farmacêuticos. Synthesis and anti-oxidant activity of a maleic sesamin analogue. 2010. (Congresso).
2. XV Congresso Paulista de Farmacêuticos. Avaliação do potencial anti-inflamatório; analgésico e antinociceptivo do extrato de baccharis Regnellii. 2007. (Congresso).