

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

**Estudo de síntese e estabilidades química e enzimática de
fármaco dirigido dendrimérico potencialmente ativo em
doença de Chagas**

João Vitor da Silva

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof. Dr. Jeanine Giarolla Vargas
Co-orientadora: Prof. Dr. Maria Terêsa Machini

SÃO PAULO
2018

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

**Estudo de síntese e estabilidades química e enzimática de
fármaco dirigido dendrimérico potencialmente ativo em
doença de Chagas**

João Vitor da Silva

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Prof. Dr. Jeanine Giarolla Vargas
Co-orientadora: Prof. Dr. Maria Terêsa Machini

SÃO PAULO
2018

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

S586e Silva, João Vitor da
Estudo de síntese e estabilidades química e enzimática de fármaco dirigido dendrimérico potencialmente ativo em doença de Chagas / João Vitor da Silva. - São Paulo, 2018.
93 p.

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

Orientador: Vargas, Jeanine Giarolla
Coorientador: Machini, Maria Teresa

1. Doença de Chagas. 2. Latenciação. 3. Pró-fármaco. 4. Dedrímico peptídico. 5. Estabilidade química e enzimática. I. T. II. Vargas, Jeanine Giarolla, orientador. III. Machini, Maria Teresa, coorientador.

João Vitor da Silva

**Estudo de síntese e estabilidades química e enzimática de fármaco
dirigido dendrimérico potencialmente ativo em doença de Chagas**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dra. Jeanine Giarolla Vargas
Orientadora/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

“Memories are like stones, time and distance erode them like acid”

Ugo Betti

AGRADECIMENTOS

Me encorajo a dizer que sem Deus nada sou, pois, a fé e o meu grande amor Nele me movem além. Essencialmente O agradeço, por trazer tudo de bom que minha vida oferece.

O molde de minha essência foram meus pais, pessoas simples, mas de grande sabedoria, mesmo na difícil batalha da vida, não só me apoiaram, me conduziram incessantemente para que buscasse aquilo que almejava, mesmo na simplicidade de não entenderem o que é, mesmo assim, cada abraço, cada palavra, cada gesto, amo-os incondicionalmente. Obrigado mãe (dona Maria) por enfrentar tudo e todos e dizer: “Não, se ele quer estudar, ele vai estudar” e obrigado pai (seu João) por todo o suporte, mesmo o senhor não entendendo muito bem nada.

Minha ‘doguinha’ (Bibi), o museu ambulante, 17 anos vividos, a cachorra mais linda do mundo, você fez parte dos melhores momentos da minha vida e dos piores também, obrigado por me consolar mesmo sem dizer uma palavra, sei que mudei muito, mas meu amor jamais mudou.

Lembro-me como se fosse ontem, mesmo passado anos, quando ficava sob os cuidados de minha irmã (Charlene) e que considero uma das melhores épocas da minha vida, mesmo ela brigando sempre comigo, onde tive-a como espelho e foi na mesma época que tive interação com o ensino, ali começou a enorme vontade por aprender. Obrigado Tata.

Inesquecivelmente, mesmo de longe, lá no Paraná, agradeço a todos meus familiares que sempre me incentivaram, principalmente minhas tias maravilhosas, que tanto sinto falta, tia Rosa, tia Lú e tia Fátima e de modo especial minha prima ‘mais legal do mundo’ Nayara Gomes.

Dizem que as coisas acontecem quando tem que acontecer, não sei até onde isso é verdade, ou se é porque peço demais as coisas pra Deus. O fato é, que eu agradeço cada minuto por ter conhecido a professora Elizabeth Igne, por essa imensidão de generosidade que ela é, desde o começo quando me conheceu, um aluno que ela conheceu em um dia e no outro já aceitou para fazer a prática em seu laboratório. Saiba que sou imensamente grato e a tenho com todo respeito e admiração, obrigado por cada palavra, cada ensinamento, cada puxão de orelha, adoro aprender com a senhora.

No fim, tudo foi da melhor maneira possível, o que dizer dessa mulher? Não, não a conhecia, topei desbravar uma nova jornada com ela, uma nova jornada para mim e para ela também, uma jornada científica cheia de desafios. Estou falando obviamente da professora Jeanine Giarolla,

a tenho como exemplo, profissional e pessoal, de toda a sua história e de como encara novos desafios. Obrigado professora, por ter me aceito também, obrigado por confiar, pela atenção, pela luta, pela seriedade. Muito obrigado mesmo, de coração.

O João das professoras, não, o João das mães científicas. Brincadeiras à parte, eu fico muito feliz por todo carinho que recebo, obrigado professora Maria Teresa Machini, por dizer sim e topar trabalhar conosco, por ser tão cuidadosa e minuciosa em tudo que se propôs, como te disse uma vez, fico feliz por ter te conhecido melhor e ver o quão incrível é seu trabalho.

Temos a família de sangue e temos a família que escolhemos, e eu sou muito grato por ter pessoas essenciais na minha vida, das quais não sei viver sem pessoas que de certa forma não somem nunca, mesmo sem nos vermos, só somam. Uma delas é o Guilherme, sabe o papel que teve em toda minha vida, desde o start acadêmico na graduação. O que seria de mim? Não sei, mas sei que você teve papel importantíssimo em tudo. Rosania, aquela que me conhece a anos, amiga do ensino médio, obrigado por me aguentar, me dar suporte, por me socorrer em cada momento, mas principalmente por estar do meu lado, mesmo eu não estando do seu. Você é demais Rosania, é demais. Bianca, aquela de anos, mas da época sofisticada, digamos assim, você pode se achar 'bravinha', mas é a pessoa mais doce que já conheci, você tem um papel fundamental em minha vida, mesmo também não nos vendo com frequência nunca deixamos de estar presente. A minha gratidão a essa família que escolhi de certa forma, e que amo tanto.

Agradeço aos meus mestres, desde a pré-escola até os atuais, de forma especial aos professores Patrícia Moriguchi, Soraya Santos, Michele Barão, Sandro Rostelato, que me iniciaram no mundo científico ainda na graduação. Muito obrigado, sou eternamente grato, vocês foram os meus degraus.

E a pós-graduação tornou-se o ambiente do qual eu passei a maior parte do tempo, nele conheci pessoas incríveis. Pessoas que espero poder levar para o resto da vida comigo, eu agradeço fundamentalmente meus amigos diretos, Bruna, Rodrigo, Débora, Cinthya, Renan, Mariana, Murielle, Cecília, Stefani, Danielle e Débora Marins, principalmente aos três primeiros que ainda se fazem presentes, obrigado por compartilhar cada ensinamento e palavra de carinho, vocês são demais. Agradeço imensamente não somente a eles, mas todos os outros que mesmo com pouco contato me ensinaram muito, pessoalmente e profissionalmente, como Alfredo, Maurício, Marina, Ricardo, Diego e todos os outros da imensa lista, agradeço por tudo que trocamos.

Agradeço aos meus amigos e colegas do vôlei e natação, funcional. Ais bons momentos e cortadas cravadas.

E agradeço imensamente a todos os funcionários e técnicos da FCF, IQ e ICB com quem tive o prazer de trabalhar e conhecer, de modo especial ao Dr. Cleber Lória, que sofreu e festejou muitos momentos nas análises de massas comigo, obrigado pela enorme paciência. A Dr. Carolina Borsoi e ao Dr. Lúcio, por nos receberem tão bem e aceitarem testar nosso composto nas culturas de *T. Cruzi*.

Sem financiamento o projeto não aconteceria, então agradeço principalmente ao CNPq por ter subsidiado todo o meu projeto me patrocinando com a bolsa. E a FAPESP por ter concedido recursos ao projeto da professora Jeanine Giarolla, vinculado a este. Meu muito obrigado.

RESUMO

SILVA, J. V. **Estudo de síntese e estabilidades química e enzimática de fármaco dirigido dendrimérico potencialmente ativo em doença de Chagas.** 2018. 93p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A doença de Chagas representa um problema de saúde pública em muitos países e regiões. O tratamento consiste em fármacos tóxicos, com eficácia discutível, principalmente, na fase crônica da doença. Assim, faz-se necessário o planejamento de novos quimioterápicos, mais seguros e eficazes. Os dendrímeros são novas arquiteturas moleculares formadas por um foco central e ramificações partindo desse foco. Apresentam diversas aplicações biológicas como, por exemplo, atuar como transportadores de fármacos. Face ao exposto, o objetivo deste trabalho foi o estudo de condições para ligar o ácido anacárdico (AA) em derivado dendrimérico com potencial ação na doença de Chagas, o qual tem como foco central o ácido succínico (AS) e ramificações compostas por arginina (Arg) e lisina (Lys). Sabe-se que a cruzaina, uma cisteíno-protease do *T. cruzi*, catalisa a hidrólise de ligação peptídica entre lisina e arginina. A síntese dos compostos em fase sólida forneceu os derivados brutos: (1) pró-fármaco AA-K-R-NH₂ e (2) G.05 AA-K(AS)-R-NH₂, que foram purificados e caracterizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e espectrometria de massas. Os compostos purificados AA-K-R-NH₂ e AA-K(AS)-R-NH₂ apresentaram rendimentos de 34% e 47%, com pureza de 88% e 98%, respectivamente. Os resultados dos experimentos enzimáticos utilizando o AA-K-R-NH₂ não foram conclusivos. Acredita-se que a baixa solubilidade e/ou baixa concentração podem ter contribuído para tal. Já na estabilidade química em pH 7,4 (que simula pH sanguíneo), pH 1,2 (que simula pH estomacal) e pH 8,5 (que simula pH intestinal), observou-se que o AA-K(AS)-R-NH₂ foi estável durante as 24 h de ensaio. Estes últimos resultados são interessantes, pois espera-se que o pró-fármaco dendrimérico alcance o *T. cruzi* estruturalmente íntegro, sofrendo hidrólise e liberação do composto ativo no interior do parasita.

Palavras-chave: doença de Chagas, latenciação, pró-fármaco, dendrímero peptídico, ácido anacárdico, estabilidade química e enzimática.

ABSTRACT

SILVA, J. V. **Synthesis, chemical and enzymatic stability studies of targeted dendrimer potentially active in Chagas disease.** 2018. 93p. Dissertation (Master degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Chagas disease is a public health problem in many countries and regions. The treatment consists of toxic drugs, with debatable efficacy, mainly, in the chronic phase of the disease. Thus, it is necessary to plan new chemotherapeutics, safer and more effective than those drugs. Dendrimers are new molecular architectures composed by a central focus and branching from that focus. They present several biological applications, such as acting as drug carriers. Thereby, the goal of this work was the study of conditions to bind anacardic acid (AA) in a dendrimeric derivative with potential action in Chagas disease, which was composed by a central focus of succinic acid (AS) and branches of arginine (Arg) and lysine (Lys). Cruzain, a *T. cruzi* cysteine protease, is known to catalyze the peptide-binding hydrolysis between lysine and arginine. Synthesis of the solid phase compounds provided the crude derivatives: (1) prodrug AA-KR-NH₂ and (2) G.05 AA-K(AS)-R-NH₂, which were purified and characterized by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and mass spectrometry. The purified AA-K-R-NH₂ and AA-K(AS)-R-NH₂ compounds showed yields of 34% and 47%, with purity of 88% and 98% respectively. The results of the enzymatic experiments using AA-K-R-NH₂ were not conclusive. It is believed that the low solubility and/or low concentration may have contributed for this. On the chemical stability at pH 7.4 (which simulates blood pH), pH 1.2 (which simulates stomach pH) and pH 8.5 (which simulates intestinal pH), it was observed that AA-K(AS)R-NH₂ was stable for 24 hours. These latter results are interesting because the dendrimeric prodrug is expected to reach structurally integral *T. cruzi*, undergoing hydrolysis and release of the active compound within the parasite.

Keywords: Chagas disease, latentiation, prodrug, peptide dendrimer, anacardic acid, chemical and enzymatic stability.

SUMÁRIO

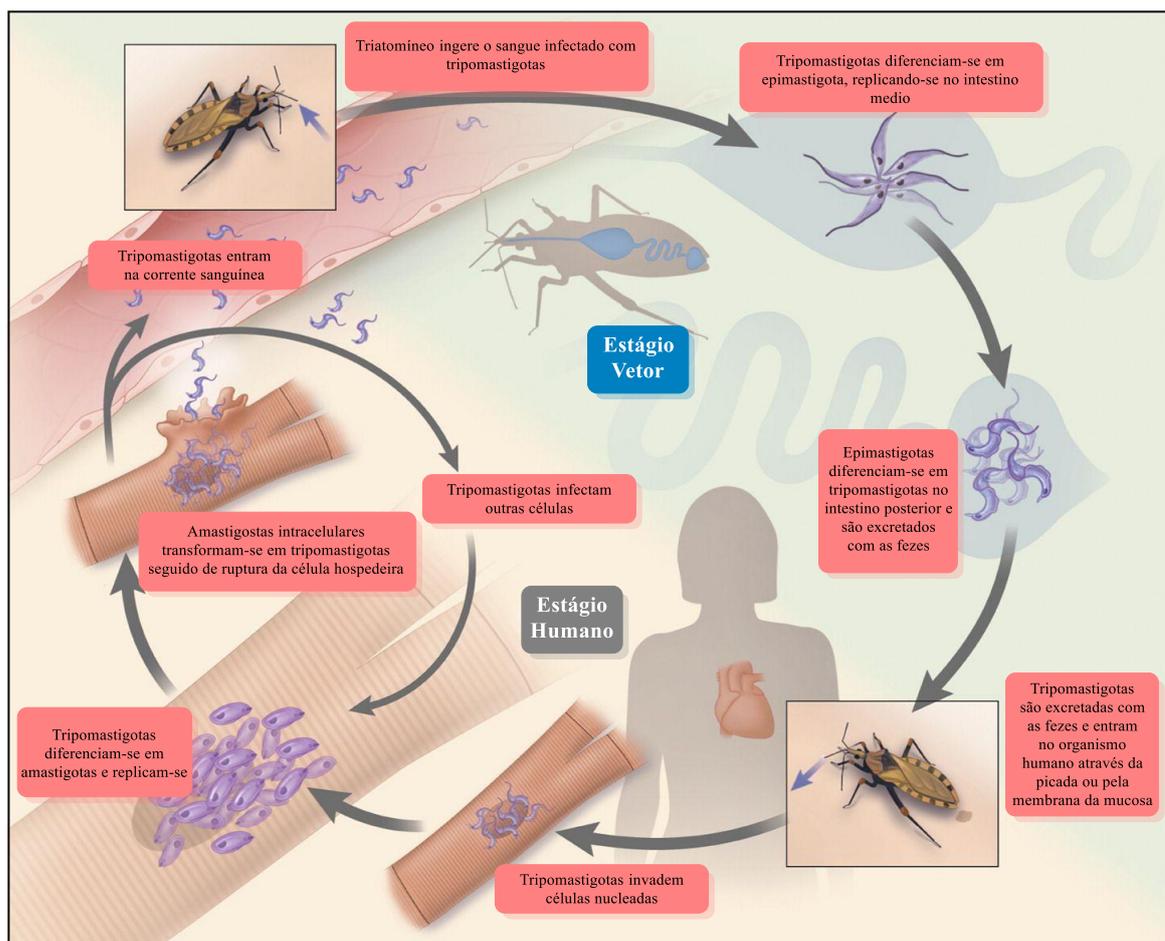
1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	DOENÇA DE CHAGAS.....	13
1.1.1	Quimioterapia.....	15
1.2	PLANEJAMENTO DE NOVOS COMPOSTOS ANTICHAGÁSICOS.....	16
1.2.1	Alvos moleculares.....	16
1.2.2	Ácido anacárdico (AA).....	18
1.2.3	Modificação molecular de fármacos.....	19
1.2.4	Síntese em fase sólida.....	27
2	CONCLUSÕES.....	30
3	PERSPECTIVAS.....	32
4	REFERÊNCIAS.....	33
	ANEXO A - FICHA DO ALUNO.....	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas que foi descoberta pelo pesquisador brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Trata-se de um protozoário unicelular e parasita intracelular obrigatório, com um único flagelo e mitocôndria. Seu ciclo de vida inclui a passagem pelo hospedeiro vertebrado (mamífero) e hospedeiro invertebrado (inseto triatomíneo) (BRENER, 1973; COURA, 2002; CARDOSO, CUNHA, BARTHOLOMEU, 2015, WHO, 2018). A infecção se inicia quando o vetor triatomíneo, durante o repasto sanguíneo, deposita suas fezes e/ou urina na pele ou mucosa do hospedeiro vertebrado, permitindo a entrada do parasita no organismo (Figura 1) (BRENER, 1973; BERN, 2015; WHO, 2018).

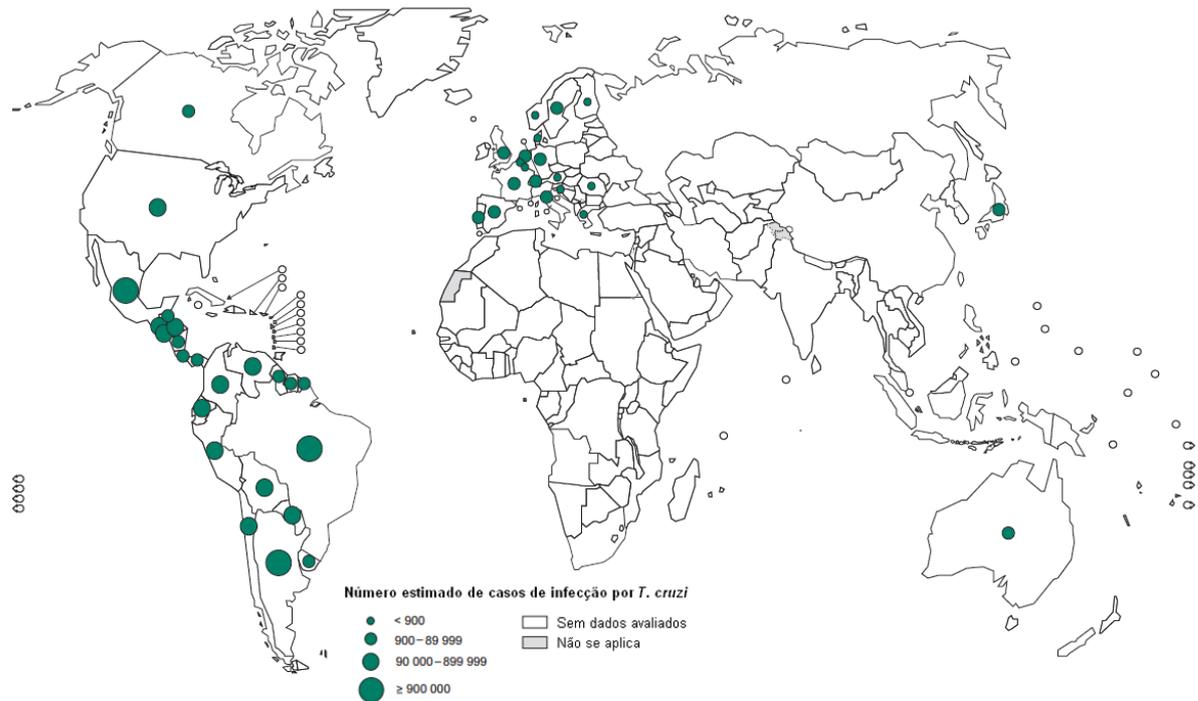
Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi* no ser humano e no vetor triatomíneo



Fonte: Bern (2015)

época da safra do açaí, sendo o alimento, portanto, a provável fonte de contaminação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

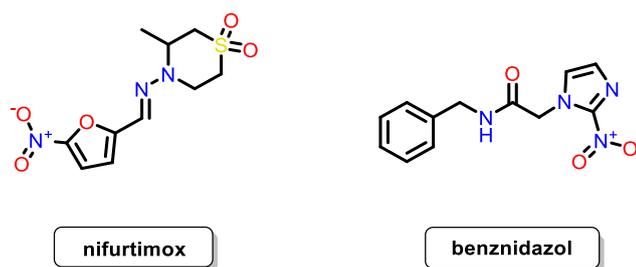
Figura 3 - Mapa global do número estimado de casos de infecção por *T. cruzi*



Fonte: WHO (2015)

1.1.1 Quimioterapia

A busca por compostos ativos na doença de Chagas iniciou no período de 1936 a 1960, com a avaliação biológica de derivados de nitrofuranos, em especial a nitrofurazona. Estes derivados, porém, mostraram-se tóxicos (DIAS et al., 2009; da CRUZ, 2013). Após uma década, surgiram dois compostos com melhorias em relação à eficácia e tolerância, sendo ativos na fase aguda da doença: o nifurtimox (3-metil-4(5'-nitro-furfurilideneamino)-tetraidro-4*H*-1,4-tiazina-1,1-dióxido), lampit® da Bayer, e o benznidazol (*N*-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida), rochagan® da Roche (Figura 4) (DIAS et al., 2009). O benznidazol deixou de ser produzido pela Roche e tem sido produzido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE) e o nifurtimox não é mais comercializado no Brasil (PORTAL BRASIL, 2014).

Figura 4 - Estrutura química dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas

Fonte: Própria autoria (2018)

Por serem altamente reativos e não seletivos, metabólitos eletrofílicos resultantes do nifurtimox e benznidazol podem atuar em diversos sistemas do organismo, causando toxicidade característica nos pacientes em tratamento (DIAS et al., 2009; da CRUZ, 2013). Existem, portanto, limitações no uso desses fármacos, tais como efeitos adversos, indução de resistência ao parasita e longo período de tratamento (COURA, de CASTRO, 2002; da CRUZ, 2013). Sonolência, náuseas, vômitos, cólicas intestinais e perda de peso são os efeitos mais comumente observados no tratamento com nifurtimox. Já para o benznidazol, verificam-se I - hipersensibilidade, edemas, febre, linfadenopatia, dores musculares e articulares; II - depressão da medula óssea; e III - polineuropatia periférica (CASTRO, MECA, BARTEL, 2006).

Apesar de todos esses anos entre a descoberta da doença e até os dias atuais, existem apenas esses dois fármacos disponíveis na terapêutica. Isso, possivelmente, devido ao pouco interesse da indústria farmacêutica por se tratar de uma doença extremamente negligenciada, que atinge prevalentemente populações carentes (WHO, 2018).

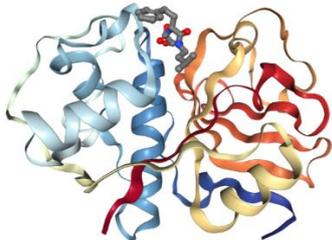
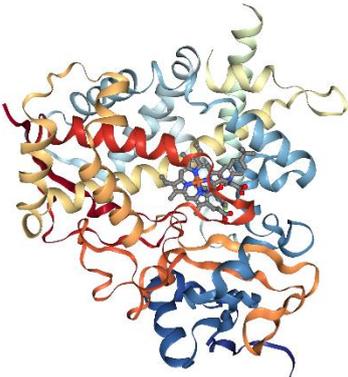
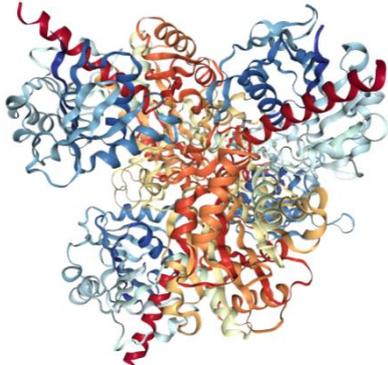
1.2 PLANEJAMENTO DE NOVOS COMPOSTOS ANTICHAGÁSICOS

1.2.1 Alvos moleculares

Com o avanço tecnológico e científico, houve aumento no entendimento do perfil genético e bioquímico do parasita. Assim, o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* contribuiu para a identificação de alvos promissores (DIAS, 2009). Alguns exemplos estão descritos no Quadro 1.

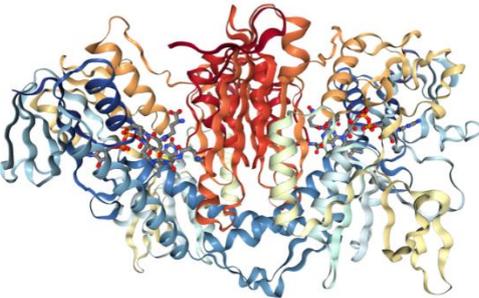
Quadro 1 - Alvos terapêuticos no planejamento de compostos antichagásicos

(continua)

		Exemplos
Proteases	Enzimas responsáveis pela catálise da quebra de ligações peptídicas. Possuem diversas funções no parasita, como as relacionadas com a invasão celular, escape do sistema imune do hospedeiro, entre outras. Proteases amplamente estudadas são as cisteíno-proteases (cruzaína), serino-proteases, metaloproteínas e treonino-proteases (COURA, 2002; MCKERROW et al., 2009; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2016).	<p>Cruzaína com o ligante WRR-99, código PDB 1EWL (BRINEN; GILLMOR; FLETTERICK, a ser publicado).</p> 
Biossíntese de esteróis	Esteróis são essenciais para as membranas celulares, além de serem precursores na biossíntese de outros compostos. São, também, fundamentais para o crescimento de organismos unicelulares. O <i>T. cruzi</i> produz o ergosterol. Algumas das enzimas mais exploradas desta via são: esterol 14-alfa dimetilase, lanosterol sintase, esqualeno epoxidase e esqualeno sintase (COURA, 2002, CRUZ, 2013; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2016).	<p>Lanosterol 14α-desmetilase com o ligante LFS, código PDB 4CKA (FRIGGERI et al., 2014).</p> 
Via glicolítica	O <i>T. cruzi</i> , em sua forma tripomastigota, não possui o ciclo do ácido tricarboxílico. Assim, considera-se que dependa altamente da via glicolítica para produção de ATP. Exemplos deste processo são as enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), a hexoquinase e a fosfofrutoquinase (URBINA, CRESPO, 1984; SOUZA et al., 1998; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2016). A via glicolítica GAPDH tem sido explorada na química medicinal, através de inibidores de origem natural e sintética. Exemplos destes inibidores são as cumarinas, flavonoides e ácidos anacárdicos (DIAS, 2009).	<p>GAPDH com o ligante chapelina, código PDB 1K3T (PAVAO et al., 2002).</p> 

Quadro 2 - Alvos terapêuticos no planejamento de compostos antichagásicos

(continuação)

<p>Grupo tióis</p>	<p>Para defesa contra estresse oxidativo, existe mecanismo que utiliza tióis antioxidantes representados pela tripanotiona, homotripanotiona, glutationa e ovotiol. Se reduzidos os níveis de tióis antioxidantes, o parasita será mais susceptível ao estresse oxidativo. As enzimas desta categoria mais exploradas no planejamento de fármacos são: tripanotiona redutase e tripanotiona sintetase (COURA, 2002; SILVA et al., 2010; SANCHEZ-SANCHEZ et al., 2016).</p>	<p>Tripanotiona redutase com o ligante tripanotiona, código PDB 1BZL (BOND et al., 1999)</p> 
---------------------------	--	---

Visto isto, a escolha do alvo biológico que desempenhe um papel essencial no organismo invasor e não no hospedeiro é interessante, obtendo-se, desta forma, a seletividade de ação. A cruzaina, uma cisteíno protease presente somente no *T. cruzi*, catalisa, preferencialmente, a hidrólise de algumas ligações peptídicas, tornando-a, portanto, um importante alvo a ser explorado. A GAPDH, que desempenha um importante papel na via glicolítica do parasita (PEREIRA et al., 2008), também pode ser considerada como promissora no planejamento de fármacos. Sabendo da necessidade dessa última enzima para a sobrevivência do *T. cruzi*, é interessante utilizar compostos que a inibam, interferindo então, em toda via energética do parasita.

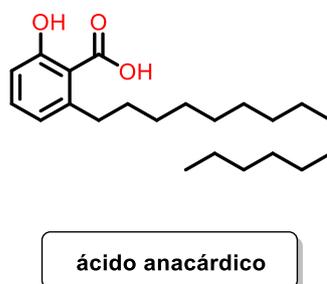
1.2.2 Ácido anacárdico (AA)

Em um estudo de Severino e colaboradores (2008) utilizando extrato da casca de castanha de caju (*Anacardium occidentale*) brasileira, observou-se que a mistura de ácidos anacárdicos extraídos possuía atividade inibitória para GAPDH. O AA é um derivado do ácido salicílico, que possui cadeia lateral alquílica com 15 átomos de carbono, podendo ser saturada ou conter de uma a três insaturações (PEREIRA, 2007; PEREIRA et al., 2008).

Sabe-se que o AA saturado, com 15 carbonos na cadeia lateral (Figura 5) é o mais potente dentre os AAs extraídos da casca da castanha de caju. Além disso, apresentam diversas propriedades biológicas, por exemplo, atividades antissépticas, vermícidas e antioxidantes. Os

achados mostram, ainda, o potencial antichagásico deste composto (PEREIRA, 2007; PEREIRA et al., 2008; SEVERINO, 2008).

Figura 5 - Estrutura química do AA saturado, potente inibidor da enzima GAPDH do *T. cruzi* (IC₅₀ 28 uM) (PEREIRA et al., 2008).

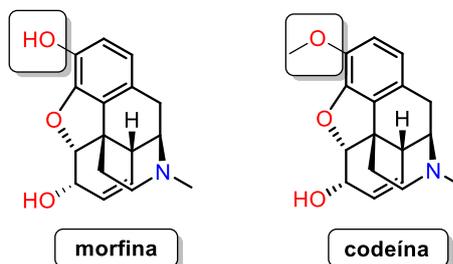


Fonte: Própria autoria (2018)

1.2.3 Modificação molecular de fármacos

A modificação molecular de compostos não se restringe apenas a realizada em laboratório. Desde o princípio da vida no planeta, a natureza já vem realizando esse processo com extrema eficiência. Um exemplo clássico é o ópio, látex extraído da papoula (*Papaver somniferum*), que contém dois alcaloides a morfina e codeína (Figura 6), as quais têm pequenas diferenças estruturais, por exemplo, a hidroxila fenólica metilada presente na codeína (TISHLER, 1964; CHUNG et al., 2005; PARISE et al., 2010).

Figura 6 - Compostos naturais: modificação molecular de alcaloides encontrados no extrato da papoula.



Fonte: TISHLER (1964)

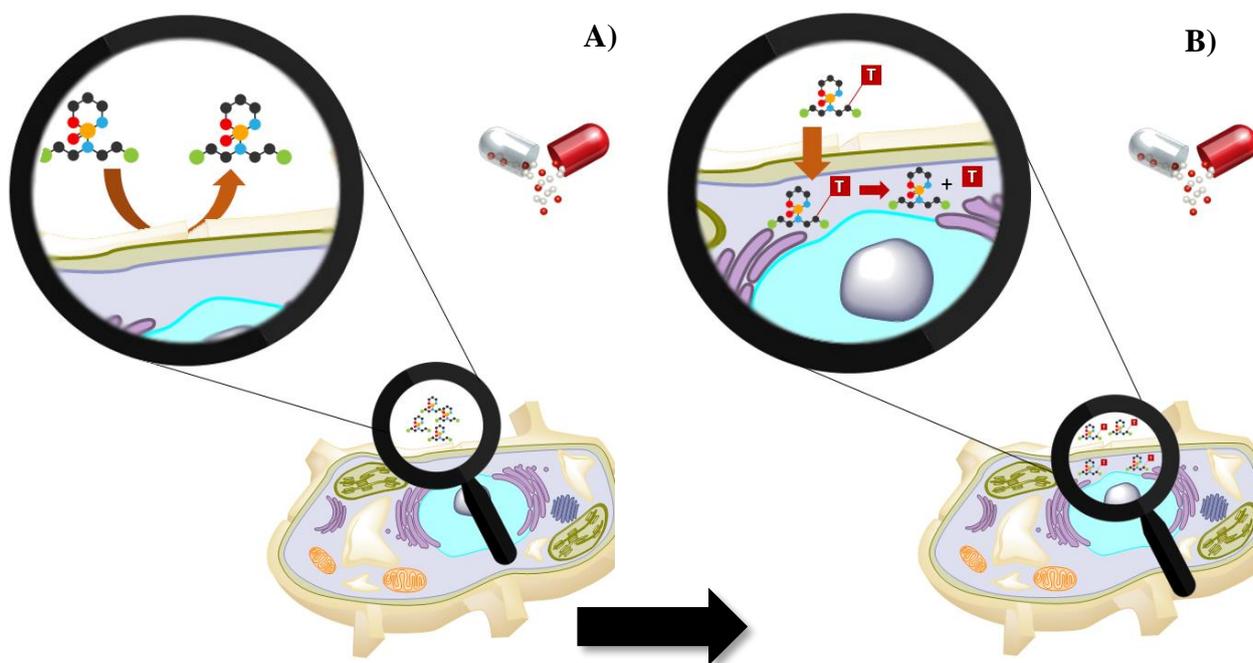
Com o intuito de melhorar problemas de um protótipo, tais como toxicidade e/ou relacionados com a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e eliminação), pode-se utilizar, então, de estratégias de modificação molecular. Dentre estas, citam-se o biososterismo, a hibridação molecular e a latenciação (WERMUTH, 2008; CHUNG et al., 2005, PARISE FILHO et al., 2010).

1.2.3.1 Latenciação

A latenciação merece destaque como método de planejamento de novos fármacos. Nela o fármaco é administrado na sua forma inativa de transporte ou menos ativa, o pró-fármaco, o qual necessita ser ativado mediante reações químicas ou enzimáticas no organismo, como esquematizado na Figura 7 (CHUNG, FERREIRA, 1999; ETTMAYER et al., 2004; CHUNG et al., 2005; NASA, 2014).

Figura 7 - Representação esquemática de fármacos e pró-fármacos frente a absorção celular. **A)**

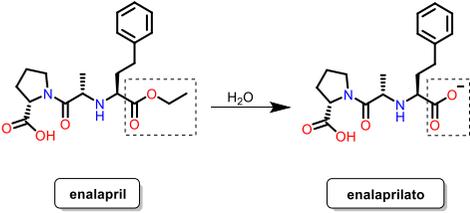
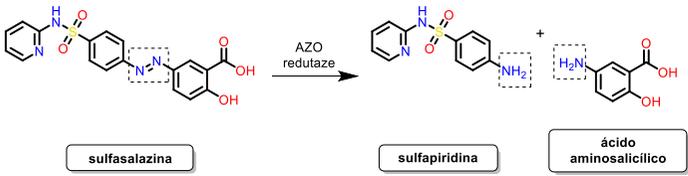
Fármaco (representado por bolinhas coloridas), não consegue atravessar membrana celular por problemas farmacocinéticos. **B)** Ocorre a adição de um transportador ao fármaco, através de ligação lábil (representado pela caixa em vermelho, com a letra T). Posteriormente, ao atravessar a membrana, ocorre a liberação do fármaco através de reações químicas e/ou enzimáticas no local, processo representado pela seta em vermelho.



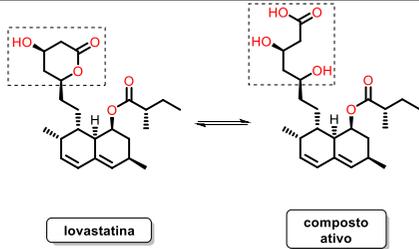
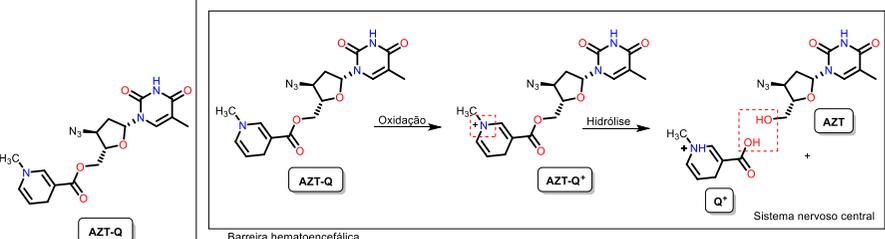
Fonte: Própria autoria (2018)

Pró-fármacos, então, podem ser utilizados para melhorar propriedades farmacêuticas, farmacocinéticas e, indiretamente, a farmacodinâmica de um protótipo, pois quanto maior a disponibilidade de fármaco no local de ação, maior será a interação com o receptor e, conseqüentemente, a resposta biológica (HARPER, 1959; NASA, 2014). Aproximadamente 10% dos fármacos disponíveis no mercado são classificados como pró-fármacos (ZAWILSKA, WOJCIESZAK, OLEJNICZAK, 2013; RAUTIO, KÄRKKÄINEN, SLOAN, 2017). Segundo Wermuth (1985), os pró-fármacos têm cinco classificações, as quais estão descritas no Quadro 2 a seguir.

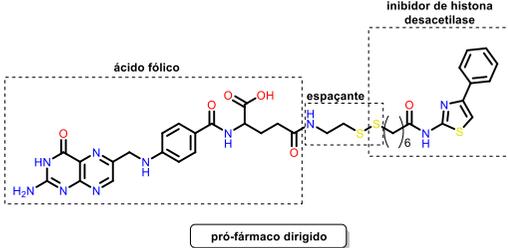
Quadro 2 - Classificações de pró-fármacos e alguns exemplos

		Exemplos
Clássicos	<p>Possuem em sua estrutura química um transportador comum, ou seja, que não possui atividade biológica e/ou seja dirigido para algum componente do organismo (CHUNG et al., 2005; PARISE FILHO et al., 2010)</p>	 <p>O pró-fármaco maleato de enalapril, éster de ácido carboxílico (caixa pontilhada), sofre hidrólise no organismo, convertendo-se em enalaprilato, forma ativa que inibe a enzima conversora de angiotensina.</p>
Recíprocos	<p>Possuem em sua estrutura química um transportador com atividade biológica, levando a um sinergismo de ação ou, até mesmo, ação em outra região do organismo (CHUNG et al., 2005; PARISE FILHO et al., 2010)</p>	 <p>O pró-fármaco sulfasalazina, que é utilizado no tratamento de colite ulcerosa, sofre ação das azo-redutases liberando sulfapiridina e ácido aminosalicílico, ambas farmacologicamente ativas.</p>

Quadro 2 – Classificação dos pró-fármacos e alguns exemplos

		(continuação)
<p>Bioprecursores</p>	<p>Não possuem transportadores e, em geral, são biotransformados em seus metabólitos ativos pelo sistema redox (CHUNG et al., 2005; PARISE FILHO et al., 2010; DHANESHWANA, JAIN, TEWARI, 2014; MISHRA et al., 2016);</p>	 <p>Lovastatina é um bioprecursores que, ao ser ativado, inibe a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A redutase. A ativação ocorre pela biotransformação através da abertura da lactona.</p>
<p>Mistos</p>	<p>Possuem características tanto de pró-fármacos clássicos, quanto as de bioprecursores. Em sua estrutura química, possuem um transportador, mas, além de sua liberação através de reações químicas e/ou enzimáticas, necessitam sofrer biotransformações para que o metabólito ativo seja produzido (CHUNG et al., 2005; PARISE FILHO et al., 2010; DHANESHWANA, JAIN, TEWARI, 2014).</p>	 <p>A zidovudina (AZT) com o transportador 1,4-diidrotrigonelina (Q) é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, ficando retida. Depois disso, o composto sofre oxidação promovendo carga no nitrogênio do anel 1,4-diidrotrigonelina (Q⁺), acumulando-se, então, no tecido cerebral. Em seguida, ocorre a quebra da ligação lábil, liberando o fármaco no local de ação.</p>

Quadro 2 – Classificação dos pró-fármacos e alguns exemplos

		(conclusão)
Dirigidos	<p>Possuem um grupo diretor, ou seja, o transportador direciona o fármaco a um local específico do organismo. Esse grupo interage seletivamente com um alvo, ou possui sensibilidade a mudanças de pH. Os alvos podem ser enzimas, receptores, membranas e, até mesmo, compartimentos ou locais com diferença de pH. A seletividade é fator determinante nessa classe de pró-fármacos. Ademais, é possível diminuir a ação inespecífica do fármaco em outros locais no organismo, consequentemente, aumentando a atividade e diminuindo os efeitos adversos. As estruturas transportadoras podem ser polímeros e substratos enzimáticos no geral, como carboidratos e peptídeos, antígenos e compostos químicos com seletividade por um dado alvo (CHUNG et al., 2005; SUZUKI et al., 2007; PARISE et al., 2010; DHANESHA, JAIN, TEWARI, 2014).</p>	 <p>Sabe-se que tecidos tumorais expressam uma grande quantidade de receptores de folato. Assim, utilizando-se um espaçante, acoplou-se um inibidor de histona desacetilase ao ácido fólico, substrato deste receptor, por meio de ligação lábil (ligação de dissulfeto) (SUZUKI et al., 2007). Conduzindo, então, o direcionamento de ação.</p>

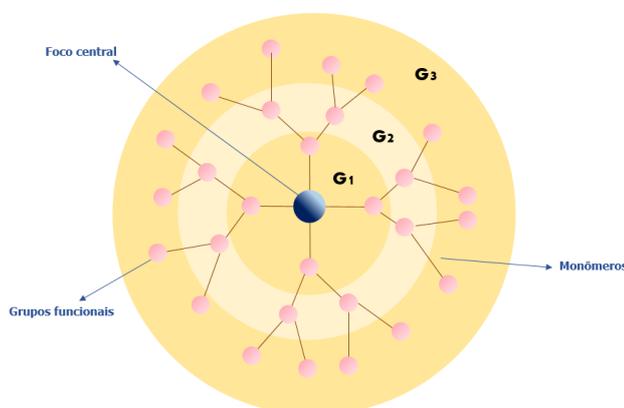
1.2.3.2 Dendrímeros como transportadores de fármacos

O termo dendrímero originou-se da palavra grega *dendron* = árvore, *meros* = parte (KLAJNERT, BRYSEWSKA, 2001), e significa novas arquiteturas moleculares, das quais partem de um centro com subsequentes camadas de ligações (ZHONGWEI et al., 2010). Apresentam excelentes propriedades, tais como boas características de dispersão, tamanho nanoscópico, cavidade interna que pode alojar o composto ativo, além de possuir grupos funcionais terminais, tornando-os úteis como transportadores de fármacos em sistemas biológicos (ZHONGWEI et al., 2010; SANTOS, FERREIRA, GIAROLLA, 2016).

Vögtle e colaboradores (1978) foram os primeiros a sintetizar estruturas em cascata. Os primeiros dendrímeros foram obtidos por Tomalia e Newkome (1985), os chamados “*starburst dendrimers*” ou dendrímeros estrelas (VÖGTLE et al., 1978; NEWKOME et al., 1985; TOMALIA, 1985; ZHONGWEI et al., 2010; ABBASI et al., 2014).

Os dendrímeros diferenciam-se de polímeros tradicionais por terem estruturas altamente regulares e simétricas, ou então propositalmente assimétricas (CAMINADE, et al., 2012). Podem ser divididos em três porções: **1) o foco central**, o qual deve possuir no mínimo dois grupos funcionais reativos para ligação com os *dendrons* (ramos); **2) os dendrons ou ramificações**, os quais se repetem pela extensão do dendrímero, e **3) grupos de superfície**, onde estão os sítios reativos (Figura 8) (SANTOS, FERREIRA, GIAROLLA, 2016).

Figura 8 - Representação esquemática do dendrímero e suas camadas de repetição (gerações). Geração 1, 2 e 3, denominadas de G1, G2 e G3.



Fonte: Própria autoria (2018)

As características estruturais dos dendrímeros levaram as suas várias aplicações na biomedicina, como por exemplo, em biomateriais. Além disso, os dendrímeros vêm sendo

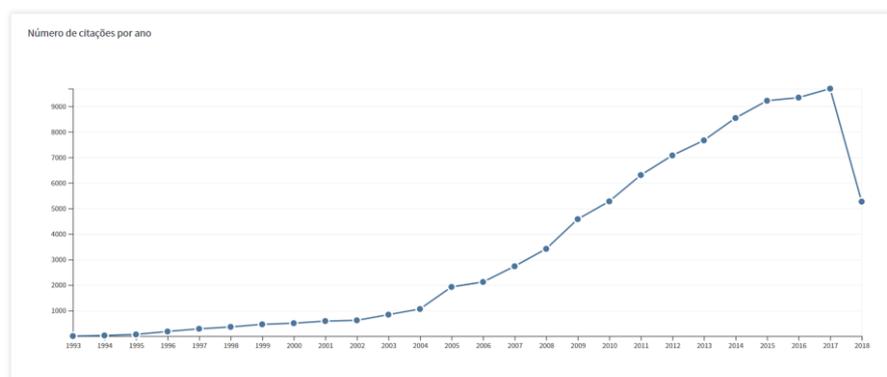
utilizados como transportadores de fármacos, por sua promissora capacidade de liberação específica e controlada, aumento no tempo de meia-vida, da estabilidade, da solubilidade em água, diminuição da imunogenicidade e da antigenicidade (ABBASI, 2014; MARKOWICZ-PIASECKA, MIKICIUK-OLASIK, 2016). Dos dendrímeros estudados atualmente, destaca-se o de poli(amidoamina) PAMAM, que é considerado promissor para várias aplicações biológicas, com número progressivo de publicações na literatura (LABIENIEC-WATALA, WATALA, 2015).

Os dendrímeros podem ser sintetizados por meio de dois métodos principais: **1) convergente**, onde o composto começa a ser construído da periferia para o centro, e; **2) divergente**, onde a síntese parte do centro para a periferia (TOMALIA et al., 1985). Para serem utilizados no desenvolvimento de novos fármacos é interessante que sejam atóxicos, não imunogênicos e capazes de atravessar membranas biológicas. Podem, também, orientar ao seu local de destino os compostos que serão transportados por eles, melhorando propriedades indesejáveis de um protótipo (TOMALIA et al., 1985; SANTOS, FERREIRA, GIAROLLA, 2016).

1.2.3.3 Dendrímeros peptídicos

Os dendrímeros peptídicos são construídos com aminoácidos, naturais ou não, que, em geral, levam a estruturas com massa de 2 kDa a 100 kDa. Possuem diversas aplicações, especialmente em biotecnologia, da qual destaca-se o papel como transportadores de fármacos. A boa estabilidade química e a similaridade que essas estruturas podem ter com macromoléculas do organismo contribuem com este resultado (SANDLER, TAM, 2002; NIEDERHAFNER, SEBESTIK, JEZEK, 2005; DARBRE, REYMOND, 2006; SANTOS et al., 2017). Em uma busca na base de dados *Web of Science* com termo “*peptide dendrimers*”, observa-se que o interesse pela comunidade científica por este assunto vem aumentando nos últimos anos, com 103 publicações em 2017, demonstrando a importância deste tema (Figura 9).

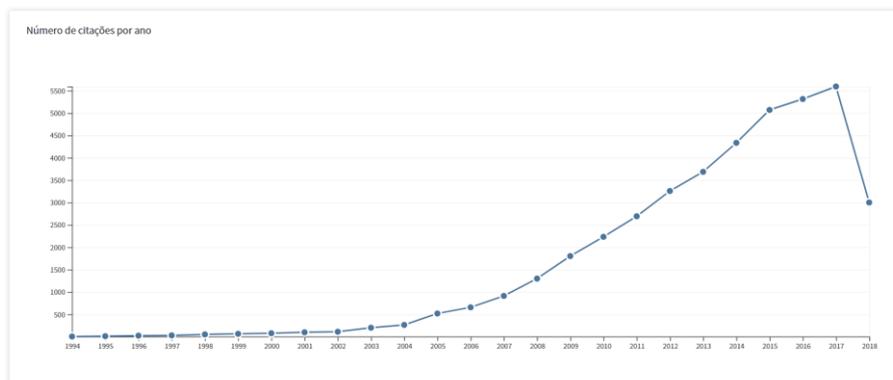
Figura 9 - Gráfico representativo do número de publicações científicas com a palavra-chave "peptide dendrimers".



Fonte: Web of Science (2018)

Já a busca com a palavra-chave “*peptide dendrimers drug delivery*”, resultou no gráfico da Figura 10, ressaltando a promissora ação destes compostos como transportadores de fármacos, com 51 publicações em 2017. Importante mencionar que estes gráficos são de caráter demonstrativo, e não analítico (estatístico), com a finalidade simplista de demonstração do estado da arte de dendrímeros peptídicos nos últimos anos.

Figura 10 - Gráfico representativo do número de publicações científicas com a palavra-chave "peptide dendrimers drug delivery".



Fonte: Web of Science (2018)

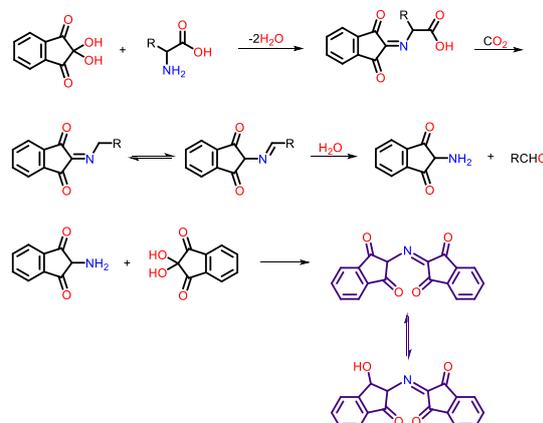
Por fim, os dendrímeros peptídicos podem ser classificados de acordo com os tipos de ligações entre os aminoácidos em: **a) covalentes** e **b) não covalentes**. Podem, também, ser sintetizados em solução ou em fase sólida, assim como descrito para síntese de peptídeos (ZHONGWEI et al., 2010; SANTOS et al., 2017).

1.2.4 Síntese em fase sólida

A síntese em fase sólida proposta por Merrifield em 1963 consiste na construção de uma cadeia de peptídeos através de um aminoácido inicial, o qual estará ancorado covalentemente a uma resina através de ligações ésteres ou amidas. A resina é insolúvel em todas as etapas sintéticas, facilitando a lavagem e filtração, eliminando excesso de reagentes, bem como de subprodutos gerados (MERRIFIELD, 1963; MACHADO et al., 2004; LOFREDO et al., 2009).

Essa estratégia sintética tem sido bastante utilizada na química combinatória (síntese de uma grande quantidade de compostos em curto período de tempo) devido sua capacidade de remoção de subprodutos por meio de lavagens. Tornou-se, então, o método mais utilizado para a obtenção de peptídeos e tem se difundido para obtenção de outras classes de compostos. Alguns aspectos, além dos acima citados, a tornam interessante, tais como a praticidade de acoplamento e de remoção dos grupos que protegem os grupos funcionais dos aminoácidos, chamados de grupos protetores, e o rápido monitoramento de toda a etapa sintética. Em geral, o monitoramento se dá pelo uso de um teste qualitativo muito sensível, chamado teste de Kaiser, ou também conhecido como teste de ninidrina (KAISER et al., 1970). Nele, através de reações químicas (Figura 11) que levam a coloração ao olho nu, é possível observar a presença ou ausência de amins primárias durante toda etapa sintética. Trata-se, deste modo, um instrumento muito útil na identificação, rápida e prática, se houve ou não acoplamento (MARQUARDT, LIMA, 2001; TARALP et al., 2002; LOFFREDO et al., 2009).

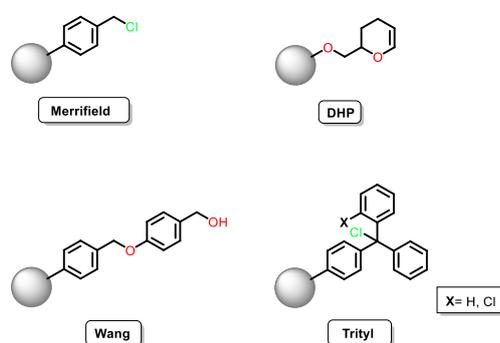
Figura 11 - Esquema de série de reações entre a ninidrina e a amina primária livre, que resultará em coloração arroxeada.



Fonte: Própria autoria (2018)

Em relação às resinas, que, no geral, possuem arcabouço de poliestireno, existem diversos tipos, como apresentadas na Figura 12. Possuem ligantes de natureza química variada.

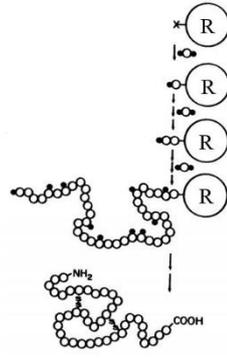
Figura 12 - Resinas para SOFS (Síntese Orgânica em Fase Sólida). Esfera em cinza representa o arcabouço polimérico da resina.



Fonte: Própria autoria (2018)

Resumidamente, a síntese em fase sólida consiste em, **1)** ligar a molécula inicial à resina, obtendo-se um complexo resina-molécula; **2)** desproteger a molécula que está vinculada à resina, deixando livre a porção que irá reagir na próxima etapa; **3)** neutralizar o complexo; **4)** ligar novos derivados de aminoácido; **5)** clivagem do produto final obtido; e, **6)** purificação do produto final (Figura 13) (MERRIFIELD, 1963).

Figura 13 - Esquema geral de síntese em fase sólida. A resina está representada pela esfera com a letra R e os aminoácidos com suas proteções estão representados pelas esferas brancas e pretas, respectivamente.



Fonte: Merrifield (1986)

2 CONCLUSÕES

Evidenciou-se que:

- Pelo uso da síntese orgânica em fase sólida convencional e aparato apropriado, obtiveram-se os intermediários o Fmoc-Lys(Suc)-Arg-NH₂ e Fmoc-Lys-Arg-NH₂ que precedem o dendrímero peptídico;
- O protocolo A-4 mostrou resultados interessantes, com formação de poucos subprodutos e com bons rendimentos;
- O método P-1 de purificação dos intermediários Fmoc-K-R-NH₂ e Fmoc-K(AS)-R-NH₂ mostrou-se promissor, fornecendo excelentes graus de pureza (> 90%);
- Apesar de não se avaliar por LC-MS os intermediários IV e V, houve indícios da formação do dendrímero peptídico de primeira geração. Faz-se necessária, entretanto, a exploração de outras rotas sintéticas para superar os problemas encontrados, como por exemplo, os testes de Kaiser inconclusivos observados a partir da síntese do intermediário III-A;
- Elaborou-se um pedido de patente baseada em todas as possibilidades de rota sintética, uma vez que, a mesma é promissora para obtenção de fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração potencialmente ativos em doença de Chagas.
- Os intermediários com AA, o AA-K-R-NH₂ e o AA-K(AS)-R-NH₂, foram obtidos, mas com certa dificuldade de síntese. O impedimento estérico devido à grande cadeia alquílica do AA pode ter contribuído para este resultado;
- No geral, o método de purificação mostrou-se eficiente. Porém, em algumas situações, por exemplo na purificação do AA-K-R-NH₂, foi necessário repetir o procedimento;
- Como trabalhou-se com quantidade limitada de matéria prima (AA), não foi possível continuar as próximas etapas sintéticas, assim como realizar novos ensaios de liberação com o intermediário AA-K-R-NH₂;
- No ensaio de estabilidade enzimática, observou-se que a solubilidade pode ter sido o responsável pelo resultado inconclusivo, assim como a baixa concentração do material de partida. E como mencionando acima, não se repetiu este experimento devido à escassez de matéria prima. A limitação do fígado de rato também deve ser considerada;
- Para o ensaio de estabilidade química em pH 7,4, 1,2 e 8,5, observou-se que o AA-K(AS)-R-NH₂ manteve-se estável em todo o período de ensaio, indicando,

possivelmente, que não aconteceria hidrólise química do composto durante o trânsito do trato gastrointestinal;

- As simulações computacionais demonstraram que os derivados ionizados, em cada pH estudado, apresentaram uma cauda apolar e uma cabeça polar próximas, o que pode ter contribuído com a estabilidade química experimental observada. Este resultado é interessante, pois deseja-se que o composto ativo seja liberado apenas no *T. cruzi*, para ação na cruzaina.

3 PERSPECTIVAS

O caráter promissor da síntese do transportador dendrimérico peptídico ficou evidente. O pró-fármaco dendrimérico puro, o AA-K(AS)-R-NH₂, foi enviado para atividade biológica *in vitro* frente ao T. cruzi. Nesta etapa, temos a colaboração da Dra. Carolina Borsoi, do Laboratório Phenotypic Screening Platform, ICB-USP. Adicionalmente, após o período de graça da patente em elaboração, pretende-se redigir os artigos relacionados.

Analisa-se, também, a possibilidade de se acoplar outros compostos ativos ou fármacos potencialmente antichagásicos neste dendrímero. Ademais, estudos detalhados de estabilidade química e enzimática serão necessários. Aqui, pretende-se determinar, cuidadosamente, cada ligação lábil do dendrímero que pode estar sendo clivada.

4 REFERÊNCIAS

- AAPPTEC. Monitoring of peptide coupling and capping. Disponível em: <https://www.aapptec.com/monitoring-peptide-coupling-capping-i-415.html>. Acesso em: 15 janeiro 2017.
- ABBASI, E. et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters*, v. 9, p. 1 - 10, 2014.
- ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS (Brasil). Doenças Negligenciadas. 2010. Disponível em: <http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-199.pdf>. Acesso em: jun. 2018.
- AMBLARD, M. et al. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular Biotechnology*, v. 33, p. 239 – 254, 2006.
- BACHEM. Solid phase peptide synthesis. Disponível em: http://documents.bachem.com/solid_phase_peptide_synthesis.pdf. Acesso em: 12 fev. 2017.
- BARBOSA, M.G.V. et al. Chagas disease in the State of Amazonas: history, epidemiological evolution, risks of endemicity and future perspectives. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, p. 27 - 33, 2015.
- BERN, C. Chagas' disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 373, p. 456 - 466, 2015.
- BOND, C. S. et al. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. *Structure Folding and Design*, v. 7, p. 81–89, 1999.
- BORDE, A. S. et al. Assessment of enzymatic prodrug stability in human, dog and simulated intestinal fluids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 80, p. 630 - 637, 2012.
- BOYSEN, R.I.; HEARN, M.T.W. High-performance liquid chromatography of peptides and proteins. In: Aminoacids, peptides and proteins in organic chemistry. Alemanha:Wiley-VCH, v. 5, p. 167 - 210, 2012.
- BRAK, K. et al. Non peptidic tetra fluoro phenoxy methyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, p. 1763 - 1773, 2010.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, v. 27, p. 347 - 382, 1973.
- BURGER, M.; LINDVALL, M. Bicyclic kinase inhibitors. WO 2010026121 A1, 11 mar. 2010.

- CASTRO, J.A.; MECA, M.M.; BARTEL, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human and Experimental Toxicology*, v. 25, p. 471 - 479, 2006.
- CAZZULO, J.J. et al. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 38, p. 41 - 8, 1990.
- CFSPH (The Center for Food Security & Public Health). American trypanosomiasis. Ames, Iowa, 2009.
- CHANG, C. Y. et al. Enzymatic stability and immunoregulatory efficacy of a synthetic indolicidin analogue with regular enantiomeric sequence. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 4, p. 522 - 526.
- CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. *Química Nova*, v. 22, p. 75 - 84, 1999.
- CHUNG, M.C. et al. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic dipeptide prodrugs of primaquine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, p. 1127 - 1131, 1997.
- CHUNG, M.C. et al. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, p. 155 - 179, 2005.
- COURA, J.R.; de CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 3 - 24, 2002.
- CUCUNUBÁ, Z.M. et al. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. *Parasites and Vectors*, v. 9, p. 42 - 55, 2016.
- da CRUZ, M.F.P. Síntese, elucidação estrutural e avaliação tripanocida de novos derivados imidazolidínicos 3,5-dissubstituídos. Recife, 2013. 83p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica Universidade Federal de Pernambuco.
- DHANESHW, S.; JAIN, A.; TEWARI, K. Design and applications of bioprecursors: A retrometabolic approach. *Current Drug Metabolism*, v. 15, p. 291 - 325, 2014.
- DIAS, L.C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, v. 32, p. 2444 - 2457, 2009.
- DOŁOWY, M.; PYKA, A. Application of TLC, HPLC and GC methods to the study of amino acid and peptide enantiomers: a review. *Biomedical Chromatography*, v. 28, p. 84 - 101, 2014.
- ETTMAYER, P. et al. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, p. 2393 - 2404, 2004.
- FRIGGERI, L. et al. Structural basis for rational design of inhibitors targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14- α -demethylase: Two regions of the enzyme molecule potentiate its inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, p. 6704 - 6717, 2014.

GALEANO, C. F. V. et al. Efficient synthesis of peptides with 4-methylpiperidine as Fmoc removal reagent by solid phase synthesis. *Journal of the Mexican Chemical Society*, v. 58, p. 386 – 392, 2014.

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

GILAR, M.; JAWORSKI, A.; MCDONALD, T. S. Solvent selectivity and strength in reversed-phase liquid chromatography separation of peptides. *Journal of Chromatography A*, v. 1337, 140 – 146, 2014.

GUPTA, D. et al. Chemical and enzymatic stability of amino acid prodrugs containing methoxy, ethoxy and propylene glycol linkers. *Molecular Pharmaceutics*, v. 6, p. 1604 - 1611, 2009.

HARPER, N.J. Drug latentiation. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, v. 1, p. 467 - 500, 1959.

HOJO, K. et al. Amino acids and peptides. XXXV. Facile preparation of *p*-nitroanilide analogs by the solid-phase method. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 48, p. 1749 - 1744, 2000.

INA, M. Dendrimer: a novel drug delivery system. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, v. 1, p. 70 - 74, 2011.

KAISER, E. et al. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry*, v. 34, p. 595 - 598, 1970.

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

LABIENIEC-WATALA, M.; WATALA, C. PAMAM Dendrimers: Destined for Success or Doomed to Fail? Plain and Modified PAMAM Dendrimers in the Context of Biomedical Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 104, p. 2 - 14, 2015.

LI, M.; WILSON, L.J.; PORTLOCK, D.E. A simple solid-phase synthesis of disubstituted guanidines using Rink amide resin as an amine component. *Tetrahedron Letters*, v. 42, p. 2273 - 2275, 2001.

LOFFREDO, C. et al. Microwave-assisted solid-phase peptide synthesis at 60 °C: alternative conditions with low enantiomerization. *Journal of Peptide Science*, v. 15, p. 808 - 817, 2009.

LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Reversed-phase chromatography of peptides. *Journal of Chromatography A*, v. 149, p. 241 - 254, 1979

- MARKOWICZ-PIASECKA, M.; MIKICIUK-OLASIK, E. Dendrimers in drug delivery. In: ___(Ed.) *Nanobiomaterials in Drug Delivery*. Alexandru Mihai Grumezescu, 1 ed., 2016. p. 39 - 74.
- MARQUARDT, M.; EIFLER-LIMA, V. L. Síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. *Química Nova*, v. 24, p. 846 - 855, 2001.
- MCKERROW, J.H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 263 - 269, 2009.
- MERRIFIELD, R.B. Solid phase peptide synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, v. 85, p. 2149 - 2154, 1963.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico - Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. 2015. 9 p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Doença de Chagas. 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 30 jul. 2018.
- MISHRA, N. et al. Targeted drug delivery: A review. *American Journal of Pharmatech Research*, v. 6, p. 1 - 24, 2016.
- NAJLAH, M. et al. Synthesis, characterization and stability of dendrimer prodrugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 308, p. 175 - 182, 2006.
- NAJLAH, M. et al. In vitro evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 336, p. 183 - 190, 2007.
- NASA, P.; PHOUGAT, P. Prodrug: A novel approach of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v. 25, p. 188 - 191, 2014.
- NEWKOME, G.R. et al. Micelles. part 1. Cascade molecules: a new approach to micelles. A [27]-arborol. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 50, p. 2003 - 2004, 1985.
- PARISE FILHO, R. et al. Prodrugs available on the Brazilian pharmaceutical market and their corresponding bioactivation pathways. *Brazilian Journal of Pharmaceutic Sciences*, vol. 46, p. 393 - 420, 2010.
- PAVÃO, F. et al. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. *FEBS Letters*, v. 520, p. 13–17, 2002.
- PEREIRA, J.M. Síntese de ácidos anacárdicos e análogos, candidatos a inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal de *Trypanosoma cruzi*. São Carlos, 2007. 191p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química – Universidade Federal de São Carlos.

- PEREIRA, J.M. et al. Anacardic acid derivatives as inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 8889 - 8895, 2008.
- PORTAL BRASIL. Brasil dobrará produção de remédios contra mal de Chagas para atender outros países. 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/10/brasil-dobrar-a-producao-de-medicamento-contra-chagas>>. Acesso em: 15 mar. 2016.
- RAUTIO, J.; KÄRKKÄINEN, J.; SLOAN, K. B. Prodrugs – Recent approvals and a glimpse of the pipeline. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 109, p. 146 - 161, 2017.
- SANCHEZ-SANCHES, M. et al. Therapeutic targets for the development of anti-*Trypanosoma cruzi* drugs: A brief review. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, v. 13, p. 227 - 243, 2016.
- SANTOS, S.S. Leishmanicidas potenciais: estudo da síntese de fármacos dirigidos dendriméricos de primeira geração com hidroximetilnitrofuril. São Paulo, 2012. 326p. Dissertação de Mestrado - Faculdade Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- SANTOS, S.S.; FERREIRA, E.I.; GIAROLLA, J. Dendrimer Prodrugs. *Molecules*, v. 21, p. 686 - 708, 2016.
- SANTOS, S.S. et al. Peptide dendrimers: drug/gene delivery and other approaches. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 95, p. 907 - 916, 2017.
- SEVERINO, R.P. Busca de produtos naturais como inibidores específicos de enzimas. São Carlos, 2008. 248p. Tese de Doutorado – Departamento de Química – Universidade Federal de São Carlos.
- SIGMA-ALDRICH. Resin for solid-phase peptide synthesis. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/Brochure/al_chemfile_v3_no4.pdf. Acesso em: 12 maio 2017.
- SILVA J.J.N. et al. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. *British Journal of Pharmacology*, v. 160, p. 260 - 269, 2010.
- SINGH, R. et al. Synthesis, pH dependent, plasma and enzymatic stability of bergenin prodrugs for potential use against rheumatoid arthritis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 25, p. 5513 - 5521, 2017.
- SOUZA, D.H.F. et al. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. *FEBS Letters*, v. 424, p. 131 - 135, 1998.
- TARALP, A. et al. Introducing freshmen students to the practice of solid-phase synthesis. *Journal of Chemical Education*, v. 79, p. 87 - 89, 2002.
- TEIXEIRA, A.R.L. et al. Pathogenesis of Chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, p. 592 - 630, 2011.

TISHLER, M. Molecular modification in modern drug research. *Advances in Chemistry*, v. 45, p. 1 - 14, 1964.

TOMALIA et al. A new class of polymers: Starburst-Dendritic macromolecules. *Polymer Journal*, v. 17, p. 117 - 132, 1985.

UHRICH, K.E. et al. The solid-phase synthesis of dendritic polyamides. *Polymer Bulletin*, v. 25, p. 551 - 558, 1991.

URBINA, J.A.; CRESPO, A. Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. 1. Hexokinase and phosphofructokinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 11, p. 225 - 239, 1984.

VÖGTLE, F. et al. Cascade and nonskid-chain-like syntheses of molecular cavity topologies. *Synthesis*, v. 2, p. 155 - 158, 1978.

WERMUTH, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors - Carrier prodrugs. In: JOLLE, G.; WOOLDRIGE, K. R. M. *Drug Design: Fact or Fantasy?* London: Academic Press, 1984. p. 47-72.

WERMUTH, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: ____ (Ed.) *The practice of medicinal chemistry*. Sand Diego: Academic Press, 4 ed., 2008. p. 721-746.

WHO (World Health Organization) (Org.). Chagas disease (American trypanosomiasis). 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 30 jul. 2018.

XIAO, N.; JIANG, Z-X.; YU, Y.B. Enantioselective synthesis of (2R, 3S)- and (2S, 3R)-4,4,4-trifluoro-*N*-Fmoc-*O*-tert-butyl-threonine and their racemization-free incorporation into oligopeptides via solid-phase synthesis. *Biopolymers*, v. 88, p. 781 - 796, 2007.

YANG, H.; LOPINA, S. T. In vitro enzymatic stability of dendritic peptides. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 76, p. 398 - 407, 2005.

ZAWILSKA, J.B.; WOJCIESZAK, J.; OLEJNICZAK, A.B. Prodrugs: A challenge for the drug development. *Pharmacological Reports*, v. 63, p. 1 - 14, 2013.

ZHONGWEI, G.U. et al. New-generation biomedical materials: Peptide dendrimers and their application in biomedicine. *Science China Chemistry*, v. 53, p. 458 - 478, 2010.

28/10/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 9382132/1 - João Vitor da Silva

Email: vitorjvs@usp.br
Data de Nascimento: 12/07/1992
Cédula de Identidade: RG - 97894590 - PR
Local de Nascimento: Estado do Paraná
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Paulista - São Paulo - Brasil - 2016

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula: 07/07/2016
Início da Contagem de Prazo: 07/07/2016
Data Limite para o Depósito: 07/01/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Elizabeth Igne Ferreira - 07/07/2016 até 07/03/2017. Email: hajudan@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Jeanine Giarolla Vargas - 08/03/2017 até o presente. Email: jeanineg@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Teresa Machini - 05/07/2017 até o presente. Email: mtmachini@iq.usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/07/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/08/2017
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 07/07/2016

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 28/10/2018 22:06:47

28/10/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 9382132/1 - João Vitor da Silva

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMF5866-4/2	Tópicos Avançados em Farmacologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/08/2016	15/11/2016	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5826-1/1	Relação entre Estrutura Química e Atividade Biológica	09/08/2016	31/10/2016	120	8	100	A	N	Concluída
FBF5777-3/7	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	11/08/2016	23/11/2016	45	3	87	A	N	Concluída
FBF5704-6/5	Análise Espectrométrica de Fármacos	06/03/2017	18/06/2017	150	10	90	A	N	Concluída
ICB5752-1/3	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	16/10/2017	29/10/2017	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBF5805-2/5	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	06/02/2018	16/04/2018	90	6	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 16/07/2018

Impresso em: 28/10/2018 22:06:47