



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA



**SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACO RECÍPROCO COM
POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PSORÍASE**

RENATO EIJI MIMURA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Márcia da Silva

ARARAQUARA - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACO RECÍPROCO
COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PSORÍASE

RENATO EIJI MIMURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do grau Farmacêutico-Bioquímico.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Márcia da Silva

ARARAQUARA - SP

2011

Dedico este trabalho aos meus pais Akio e Márcia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Akio e Márcia pelo apoio dado em todos esses anos de graduação e pela oportunidade de formação nesta universidade;

À minha orientadora Márcia da Silva pelo apoio e incentivo na iniciação científica e elaboração deste trabalho de conclusão de curso;

Ao Prof. Marlus Chorilli pela ajuda em parte do projeto;

À Maíra Mormillo Veneziani pelo apoio, carinho e incentivo dado nesses últimos anos e para execução desse trabalho;

E a todos os meus irmãos “Varzeanos”, companheiros de república, principalmente aos que convivi, Tarciso, Fabio (Quasy), Daniel (Sashimi), Rodrigo (Vampeta), Raphael (Batatinha), Vander (Lester), Luiz Augusto (Xavasco), Enzo (Kushiro), José Antônio (Medelin), Richard (Muringa), Hugo (Kusono), Victor Augusto (Grafite), Lucas (Bar-rata), Victor Aparecido (Barbiroto), João (Paquito), Kleber (Kuririn), Glauco (Butt), Caio (Shirley), Mohamed (Abu), Gabriel (Frotinha), Henrique (Nimbus), Rafael (Leitão), Igor (Placebo), Victor Artêmio (Planária), Guilherme (Rosca), Gustavo (Azeite) e Edna pela convivência em todos esses anos de formação, amizade e contribuição fundamental na minha formação pessoal. Sem isso, nada disso seria possível.

Muito obrigado a todos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO	24
3. DESENVOLVIMENTO	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
Considerações gerais das reações	35
4.1. Materiais de síntese	35
4.2. Métodos de síntese	35
4.2.1. Síntese dos derivados ftalimídicos	35
4.2.1.1. Síntese do 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona	35
4.2.1.2. Síntese do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil	35
4.2.2. Síntese do pró-fármaco	36
4.3. Métodos Analíticos	37
4.3.1. Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV)	37
4.3.2. Espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono 13 e de hidrogênio (RMN ¹³ C e ¹ H)	37
4.3.3. Faixas de fusão	37
4.3.4. Cromatografia em camada delgada (CCD)	38
4.4. Métodos de purificação	38
4.4.1. Destilação de solvente à pressão reduzida	38
4.4.2. Recristalização	38
4.5. Validação da metodologia analítica	38
4.5.1. Linearidade	38
4.5.2. Precisão	39

4.5.3. Limite de detecção	39
4.5.4. Limite de quantificação	40
4.5.5. Exatidão	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1. Síntese dos derivados ftalimídicos	42
5.1.1. Síntese do 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona	42
5.1.2. Síntese do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil	46
5.2.3. Síntese do pró-farmaco	49
5.3 Validação de método analítico	53
6. CONCLUSÕES	57
7. PERSPECTIVAS	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

RESUMO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele caracterizada pela hiperproliferação dos queratinócitos. Apesar de não se conhecer a causa da doença, sabe-se que ela envolve uma série de alterações no sistema imune inato e adquirido, principalmente. Entre essas alterações estão o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral α (TNF- α).

O metotrexato é um antineoplásico análogo do ácido fólico, mas que tem seu uso consolidado no tratamento da psoríase. Sua ação principal está na inibição indireta de células em crescimento exponencial, como células tumorais e em proliferação.

A modulação dos níveis de TNF- α vem a ser uma boa alternativa para o controle da psoríase. A talidomida foi o primeiro fármaco que desempenhava tal atividade, mas devido a sua teratogenicidade deixou de ser utilizada. Descobriu-se que a função antiinflamatória estava relacionada à parte ftalimídica da molécula. Então, a partir daí passou-se a sintetizar derivados que pudessem ter a mesma atividade, porém com toxicidade reduzida.

Esse trabalho visa a síntese de um pró-fármaco recíproco, com a finalidade de uso tópico, unindo as atividades antiinflamatórias e antiproliferativa do metotrexato e imunomoduladora do derivado ftalimídico, o cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil, para a redução de efeitos adversos e toxicidade decorrente do tratamento, visando a melhora da qualidade de vida do paciente.

ABREVIATURAS

- CCD - Cromatografia em camada delgada
- DFR - Diidrofolatoredutase
- IV - Infravermelho
- MTX - Metotrexato
- RMN ^{13}C e ^1H - Ressonância magnética nuclear de carbono 13 e de hidrogênio 1
- UV – Ultravioleta
- NCE - Nova entidade química
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- NaOH – Hidróxido de sódio
- TNF- α – Fator de necrose tumoral
- REA – Relação entre estrutura quím-atividade
- KBr – Brometo de potássio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lesões de psoríase vulgar	13
Figura 2 - Psoríase gutata	13
Figura 3 - Psoríase eritrodérmica	14
Figura 4 - Psoríase ungueal	14
Figura 5 - Psoríase palmo-plantar	14
Figura 6 - Biotransformação do enalapril.	26
Figura 7 - Pró-fármaco recíproco de sulfapiridina e ácido aminossalicílico (5ASA).	27
Figura 8 – Representação esquemática da reação de obtenção do 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona. Anidrido ftálico (a), anilina (b), 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (c).	35
Figura 9 – Representação esquemática da reação de obtenção do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil. Ácido clorossulfônico (d), 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (c), cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil (e).	36
Figura 10 – Representação esquemática da reação de obtenção do pró-fármaco. Metotrexato (f), cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil pró-fármaco (e), pró-fármaco (PF_{REM}).	37
Figura 11 – Mecanismo de ação de formação da 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona	43
Figura 12 – Mecanismo de ação para a formação do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil.	47
Figura 13 - Gráfico da curva padrão e linearidade	54
Figura 14 – Estruturas químicas dos compostos sintetizados.	65

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 - Espectro de absorção no infravermelho do derivado ftalimídico	44
Espectro 2 - Espectro de RMN ¹³ C do derivado ftalimídico	45
Espectro 3 - Espectro de RMN ¹ H do derivado ftalimídico	45
Espectro 4 - Espectro de absorção no infravermelho do Pró-fármaco	48
Espectro 5 - Espectro de RMN ¹³ C do Pró-fármaco	49
Espectro 6 - Espectro de RMN ¹ H do Pró-fármaco	49
Espectro 7: Espectroscopia de RMN ¹³ C do Pró-fármaco (PF _{REM}).	52
Espectro 8: Espectroscopia de RMN ¹ H do Pró-fármaco (PF _{REM}).	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Solubilidade do pró-fármaco	50
Tabela 2 - Relação concentração teórica e absorvância	53
Tabela 3 - Coeficiente angular e intercepto das amostras	54
Tabela 4 - Absorvâncias do teste de repetibilidade	55
Tabela 5 - Concentração média determinada (CMD), desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das amostras	55
Tabela 6 - Exatidão da amostra do pró-fármaco	56

1. INTRODUÇÃO

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele e das articulações, caracterizada pela hiperproliferação dos queratinócitos. Considerava-se que a base da etiopatogenia da doença era apenas um distúrbio dos queratinócitos da pele, mas, atualmente, sabe-se que envolve também uma alteração imunológica mediada pela resposta do tipo Th1 (ROMITI et al., 2009).

É uma doença crônica que não possui cura em definitivo, pode apresentar melhoras do seu quadro clínico, mas retorna periodicamente. Apesar de não comprometer a funcionalidade do corpo humano em seus estágios mais leves, se não for controlada pode afetar diversas áreas do corpo e o seu controle fica ainda mais difícil. É comprovado que o tabagismo e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas podem desencadear ou agravar o estado clínico da doença, assim como o estado emocional do paciente pode interferir na intensidade da moléstia.

Esta dermatose acomete igualmente homens e mulheres do mundo inteiro. Aspectos ambientais, geográficos e étnicos interferem na sua incidência, sendo menos comum nas regiões tropicais e subtropicais. O pico do início da doença encontra-se entre duas faixas etárias, uma aos vinte e outra aos cinquenta anos, associando-se a antígenos de histocompatibilidade distintos (ARRUDA et al., 2001). Casos de psoríase que se iniciam na infância estão relacionados com maior frequência a casos familiares (KRUGER; DUVIC, 1994).

A patogenia da doença envolve uma aceleração do ciclo germinativo epidérmico, com aumento das células em proliferação e diminuição do tempo de renovação celular tanto da lesão, quanto da pele normal (ROMITI, 2009). A imunopatogenia da psoríase é complexa e envolve alterações do sistema imune inato e adquirido, pois as células do sistema imune inato ativadas produzem fatores

de crescimento, citocinas e quimiocinas, que atuam sobre as células do sistema imune adquirido.

Clinicamente a psoríase pode se manifestar de diversas maneiras, dependendo também do grau em que a moléstia se encontra. Mas de forma geral sempre apresenta as seguintes características: eritema, escamação e edema e é classificada em:

➤ Psoríase vulgar: formação de placas de vários tamanhos, avermelhadas e secas em partes do corpo como o couro cabeludo e extremidades do corpo;



Figura 1: Lesões de psoríase vulgar (LIMA, 2011).

➤ Psoríase invertida: lesões úmidas e locais como dobras do corpo;

➤ Psoríase gutata: lesões em forma de gota associadas a processos infecciosos;



Figura 2: Psoríase gutata (LIMA 2011).

➤ Psoríase eritrodérmica: lesões com episódios de febre e comprometimento sistêmico, em quase toda a totalidade do corpo (75%);



Figura 3: Psoríase eritrodérmica (PSORÍASE, 2010)

➤ Psoríase ungueal: atinge as unhas dos pés e mãos;



Figura 4: Psoríase ungueal (LIMA, 2011).

➤ Psoríase artropática: afeta as articulações do corpo, provocando artrite;

➤ Psoríase pustulosa: lesões com formação de pus e;

➤ Psoríase palmo-plantar: lesões que afetam a palma das mãos e sola dos pés, formando fissuras de difícil tratamento (TAKAHASHI, 2009).



Figura 5: Psoríase palmo-plantar (www.dermatologia.net).

Apesar de ser desconhecida a causa da psoríase, sabe-se que são necessários fatores ambientais, imunológicos e genéticos para que a doença se desenvolva. A hereditariedade constitui um fator importante, pois quando transmitida a suscetibilidade à doença dos pais para o filho, aumenta a probabilidade em desenvolvê-la. Mas para que a psoríase se expresse clinicamente é necessário que o paciente desenvolva na pele uma resposta imunológica mediada por linfócitos T (MARTINS; ARRUDA, 2004).

Os fatores ambientais desencadeantes da doença geralmente são traumas mecânicos, infecções, medicamentos e estresse emocional. A ativação dos queratinócitos da pele leva à produção, principalmente, de citocinas como a Interleucina-1 e o fator de necrose tumoral alfa (IL-1 e TNF- α). Essas citocinas ativam as células dendríticas da epiderme e da derme, que por sua vez, juntamente com os queratinócitos, produzem uma série de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento.

As células dendríticas ativadas processam um antígeno que é apresentado aos linfócitos T do linfonodo regional. Os linfócitos T dos pacientes com psoríase diferenciam-se preferencialmente em LTCD4+ tipo 1 (produtor de INF- γ , TNF- α e IL-2) e tipo 17 (produtor de TNF- α , IL-6, IL-17, IL-22) e LTCD8+ tipo 1 (produtor de INF- γ , TNF- α , perforinas e granzima B). Os linfócitos T migram para a derme e a epiderme encontrando macrófagos e as células dendríticas, cuja sua interação provoca a amplificação do processo inflamatório (SANCHEZ, 2010). As interleucinas 1 e 6 são as principais responsáveis pela hiperproliferação dos queratinócitos, atuam como mitógenos para esse tipo de célula, assim como o INF- γ (MARQUES, 2009).

O tratamento da psoríase vai depender do estágio em que a doença se encontra, em casos mais leves a monoterapia tópica costuma ser eficiente no

controle das lesões. Já os casos moderados a grave, a terapia tópica associada a uma fototerapia e/ou uma terapia sistêmica aceleram o processo de melhoria, com mais conforto (MARTINS; CHAUL, 2009).

Para o tratamento tópico das lesões encontram-se os seguintes medicamentos: corticosteróides tópicos, análogos da vitamina D, alcatrão, antralina, imunomoduladores e retinóides tópicos.

Os corticosteróides são conhecidos por possuir boa atividade anti-inflamatória, pela ação na redução da quimiotaxia leucocitária, da síntese de moléculas pró-inflamatórias, da liberação de citocinas e da permeabilidade capilar. Além disso, os corticosteróides desempenham uma atividade antiproliferativa, imunossupressora, vasoconstritora e antipruriginosa. Quando usados topicamente e de forma correta, a probabilidade dos corticosteróides apresentarem reações adversas é pequena, mas dentre as possíveis manifestações pode-se citar: atrofia cutânea epidérmica e dérmica, branqueamento da pele, hipertricose, eritema, erupções acneiformes, dermatite perioral e de contato, e infecções bacterianas, virais e fúngicas. Se absorvido percutaneamente os efeitos sistêmicos mais comuns são a síndrome de *Cushing*, aumento da glicemia e da pressão arterial, osteoporose e diminuição do cortisol plasmático (MARTINS; CHAUL, 2009).

Os análogos da vitamina D (calcitriol e calcipotriol) possuem ação semelhante a um corticosteróide de grau III de potência, sua ação está na inibição da proliferação epidérmica, na modificação da resposta imune pela ligação aos receptores de vitamina D e no estímulo da diferenciação dos queratinócitos. Recomendados para formas leves a médias da psoríase. Os efeitos adversos mais comuns são de irritação cutânea local, ardor, prurido eritema, foliculite e alterações na pigmentação local (MARTINS; CHAUL, 2009).

A antralina não possui mecanismos de ação bem esclarecidos, mas acredita-se que sua atividade está ligada à redução da atividade mitótica das células epidérmicas. É indicada para os tipos de psoríase em placas, ungueal e do couro cabeludo. É contra-indicada nas psoríases eritrodérmica e pustulosas. O eritema e a sensação de queimação nas lesões são os principais efeitos adversos. Apesar de ser considerado um antipsoriástico eficaz, por oxidar-se no contato com o ar, a antralina causa manchas na pele e nas vestimentas, o que limita seu uso (MARTINS; CHAUL, 2009).

O alcatrão tem eficácia moderada no tratamento da psoríase, o coaltar é a principal substância dessa classe. Devido ao odor desagradável o alcatrão é considerado como opção alternativa para o tratamento. Já os imunomoduladores e retinóides tópicos possuem estudos que comprovam sua eficácia na terapia antipsoríase, mas a sua utilização ainda é limitada no Brasil (MARTINS; CHAUL, 2009).

O tratamento sistêmico da doença é iniciado em casos mais graves da doença, isto é, nas psoríases do tipo eritrodérmica, pustulosa generalizada e artroestática. Os fármacos mais utilizados na terapia sistêmica são o metotrexato, a acitretina e os imunomoduladores biológicos.

O metotrexato é um fármaco também utilizado no controle de neoplasias devido a sua ação antimetabólica. É um análogo do ácido fólico e atua de forma competitiva na inibição da enzima diidrofolato-redutase (DFR), resultando na inativação da timidilato sintetase (responsável por transformar o ácido desoxiuridílico em ácido desoxitimidílico) e atuando indiretamente na síntese de dna. sua ação é efetiva em células em crescimento exponencial, ou seja, células tumorais e em proliferação.

De acordo com Martins e Arruda *“Seu uso como antipsoriástico foi aprovado pelo FDA em 1971, inicialmente devido a seu efeito nos queratinócitos em rápida divisão, mas descobriu-se que também possui um efeito antiinflamatório diminuindo a quimiotaxia dos polimorfonucleares, inibindo a inflamação cutânea C5-induzida, diminuindo a quimiotaxia B4-induzida e o número de células OK-T6 positivas na epiderme. Enfim, a eficácia do MTX na psoríase deve-se também a suas propriedades imunomoduladoras, freando a produção de IL-1 e diminuindo a densidade de células de Langherhans na epiderme, parecendo ainda ter efeito nas células apresentadoras de antígeno”* (MARTINS; ARRUDA, 2004).

A dose recomendada semanalmente varia entre 7,5 a 30 mg. A longo prazo o principal efeito colateral é a toxicidade hepática cumulativa, no qual há grandes chances de se desenvolver fibroses e cirroses. Portanto, biópsias hepáticas são importantes no início do tratamento e no seu monitoramento. Já as reações adversas relatadas do uso do metotrexato na psoríase são: leucopenia, trombocitopenia, anemia megaloblástica, cefaléia, mal-estar geral, vertigens, dificuldade de concentração, distúrbios digestivos, ulcerações gástricas, alopecia, fotossensibilidade, urticária, febre e depressão. Com isso, o monitoramento laboratorial dos parâmetros bioquímicos do sangue e das enzimas é importante (MARTINS; ARRUDA, 2004).

O metotrexato é contra-indicado nos seguintes casos: gravidez e amamentação, portadores do vírus do HIV, consumo excessivo de álcool (mais que 100 g diários), indivíduos imunodeficientes, hepatite, cirrose, doença infecciosa ativa, úlcera gastroduodenal, hemoglobina baixa (abaixo de 10 g/dL), leucopenia (abaixo de 3000/mm³) e plaquetas abaixo de 100.000/mm³ (MARTINS; ARRUDA, 2004).

A acitretina é um retinóide sintético de segunda geração. É um antipsoriástico que a ação também está associada no controle de algumas dermatoses, distúrbios de queratinização, linfomas cutâneos e na quimioprevenção e tratamento de câncer cutâneo em genodermatoses. Os retinóides são conhecidos por atuarem em receptores nucleares, o que altera uma série de expressões gênicas que alteram o desenvolvimento da doença. O mecanismo na psoríase não é esclarecido, o que se sabe é que possui um efeito antiinflamatório, imunomodulador (mas não imunossupressor) e de controle do crescimento e diferenciação das células epidérmicas (MARTINS; ARRUDA, 2004).

Assim como para o metotrexato é necessário realizar uma série de exames pré-clínicos, o que inclui hemograma completo, glicose, uréia, creatinina, colesterol total, triglicérides e enzimas hepáticas. Dos efeitos adversos decorrentes do uso da acitretina o mais perigoso é a teratogenicidade, portanto é absolutamente contraindicado na gravidez. Dentre os efeitos adversos mais comuns pode-se citar: queilite, boca seca, nariz seco, epistaxe, prurido, fotossensibilidade, descamação cutânea, dificuldade de cicatrização, deformação ungueal, alopecia, vaginite, uretrite e sangramento retal. Além disso, a longo prazo pode provocar hiperlipidemia e hepatotoxicidade e osteoporose. Comparado ao metotrexato, a acitretina pode promover um tratamento mais prolongado, uma vez que os efeitos colaterais são toleráveis e passíveis de controle mediante ajuste de dose (MARTINS; ARRUDA, 2004).

Os imunomoduladores biológicos constituem nova alternativa que passou a ser utilizada no controle, prevenção ou cura de doenças em humanos. De acordo com o FDA, por definição, os biológicos representam uma classe de agentes derivada de material vivo (humano, vegetal, animal ou microrganismo) (MENTER et

al., 2003). As terapias biológicas incluem: preparados biológicos, como derivados do sangue e vacinas; peptídeos ou proteínas recombinantes, como hormônio de crescimento e eritropoietina; terapias com anticorpos; terapias com ácidos nucleicos e terapias genéticas e celulares (ARRUDA et al., 2004).

Algumas estratégias são utilizadas para a produção dos imunomoduladores biológicos, das quais tentam restringir as vias de desenvolvimento conhecidos da doença. As estratégias adotadas são:

- Eliminação ou diminuição de linfócitos T (como a psoríase é mediada por células T, a indução da morte celular desse tipo de célula pode levar ao controle da doença);
- Bloqueio das interações intercelulares (pois diminuindo a interação entre as células dificulta a migração de células T para a pele);
- Desvio no sistema imune (células T tipo 1 e suas citocinas são pró-inflamatórias, a produção de células T tipo 2 em doses fisiológicas ou superiores pode levar à redução da atividade ou produção das células tipo 1) e;
- Inativação de citocinas (a inibição de citocinas, como o TNF- α , pode reduzir a manifestação da psoríase) (ARRUDA et al., 2004).

Para o desenvolvimento desse tipo de imunomoduladores leva-se em consideração três tipos de exigências: a especificidade da ligação do agente, a ligação do agente deve desempenhar um efeito desejado e duradouro, e os agentes devem ser imunologicamente “silenciosos” (não estimular o sistema imune) (ARRUDA et al., 2004).

Representantes de uma nova modalidade no controle de doenças dermatológicas, seu uso pode promover uma melhora significativa na qualidade de

vida do paciente, porém o cuidado com a toxicidade, a imunidade, a teratogenicidade e a carcinogenicidade devem ser atentados e estudados. O custo ainda é muito alto (cada dose cerca de R\$12.000,00 a R\$ 20.000,00), o que torna quase impraticável em países em desenvolvimento, sendo somente utilizado como terapia de suporte ou rotação (ARRUDA et al., 2004).

A psoríase conta também com terapia auxiliar à medicamentosa que se apresenta muito eficaz, a fototerapia. Na fototerapia faz-se o uso de irradiação ultravioleta A ou B associada a uma substância (tópica ou sistêmica) que se ativa pela irradiação e desempenha o papel antipsoriástico. O PUVA (Psoralênico + ultravioleta A) é um exemplo, administra-se oralmente o psoralênico (compostos furocumarínicos de plantas) que estimuladas pelo ultravioleta de comprimento entre 320 a 400 nm, liga-se às bases pirimidínicas do DNA causando reações fotoquímicas na pele (ARRUDA et al., 2004).

A associação com medicamentos sistêmicos é indicada para reduzir o tempo de tratamento, a dose, os efeitos colaterais e aumentar a eficácia da terapia nos casos mais graves. Essa alternativa visa expor o paciente a uma menor dose do medicamento e menor tempo de exposição à radiação ultravioleta (ARRUDA et al., 2004).

Para o início do tratamento é necessário uma série de avaliações dos padrões enzimáticos e bioquímicos do corpo, tais como, TGO, TGP, fosfatase alcalina, gama GT, uréia, creatinina, além de uma avaliação oftalmológica. Esse tipo de terapia é contra-indicada para pacientes que contam com xeroderma pigmentoso, albinismo, dermatoses fotossensíveis e em pacientes com antecedentes familiares de câncer da pele (ARRUDA et al., 2004).

Os efeitos colaterais dividem-se entre agudos e crônicos. Dentre os efeitos agudos pode-se citar: distúrbios gastrintestinais, cefaléia, tontura, insônia, depressão, eritema, onicólise, hemorragia subungueal, taquicardia e hipertricose. Dentre os efeitos crônicos estão: carcinogênese, fotoenvelhecimento, catarata, xerose e alterações dos pigmentos da pele. O tratamento com UVA e UVB é considerado carcinogênico, mas devido à associação com outras terapias medicamentosas não permitem verificar a influência no câncer de pele. Os casos de melanoma estão evidenciados nos tratamentos mais agressivos, nos quais é indicado exame dermatológico regular (DUARTE et al., 2009).

Atualmente não há estudos que comprovem a carcinogenicidade da fototerapia juntamente com terapias imunossupressoras, portanto considera-se a fototerapia uma alternativa segura, que vem sendo muito estudada (DUARTE et al., 2009).

Assim como todo tratamento de um paciente seja ele medicamentoso, psicológico ou físico, o principal foco está na melhoria da qualidade de vida da pessoa. A psoríase mesmo sendo uma doença que acomete 1 a 3% da população possui um impacto negativo significativo na qualidade de vida desses indivíduos.

Estudos realizados por meio de entrevistas e questionários relatam que as maiores dificuldades encontradas dentre as pessoas que desenvolvem a doença estão na interação no local de trabalho, na socialização com membros da família e amigos, na exclusão em locais públicos, na procura de emprego, na vida sexual e até na contemplação do suicídio. Aos que desenvolvem a psoríase artropática a vida diária também fica comprometida, com dificuldades de usar as mãos, sentar-se por longos períodos e andar (KRUEGER et al., 1998).

O estudo demonstrou também que o grupo com idade entre 18 e 34 anos relatou maior sofrimento emocional com a psoríase. Cerca de 88% preocupam-se com a piora da doença, 81% sentem-se envergonhados quando as pessoas vêem a doença, 90% sentem-se frustrados com a ineficácia dos tratamentos, 75% sentem-se pouco atraentes e 54% relataram sentir depressão (KRUEGER et al., 1998).

É uma doença que causa grande morbidade psicossocial e diminuição na função ocupacional. A incapacidade física e mental, em 300 pacientes de psoríase, foi comparável ou maior que a encontrada em pacientes com doenças crônicas, como câncer, artrite, hipertensão, doença cardíaca, diabetes e depressão (RAPP et al., 1999).

A psoríase pode ser uma morbidade que afeta uma parcela da população, mas os pacientes que desenvolvem a doença se mostram preocupados em curar-se ou a melhorar o quadro clínico presente. Mesmo sendo uma moléstia que funcionalmente não compromete o dia-a-dia do indivíduo, é uma doença crônica, que ainda não se conhece a cura, o tratamento é prolongado e, gera diversos efeitos indesejáveis. A qualidade de vida é um fator importante a ser considerado no seu tratamento, visto que, o que mais causa incômodo na psoríase são as lesões de modo geral, a aparência que elas causam ao indivíduo, afetando-o muito psicologicamente. Portanto, quanto melhor forem os resultados apresentados pelos medicamentos, melhor será a adesão e trará maior bem-estar ao paciente. O desenvolvimento de novos fármacos antipsoriásticos que apresentem menores efeitos adversos pode ser uma alternativa para a melhora da clínica, mas principalmente da qualidade de vida do paciente.

2. OBJETIVO

Este Trabalho de Conclusão de Curso tem como objetivo a síntese de um pró-fármaco recíproco derivado do metotrexato e de um composto ftalimídico, com vistas ao uso tópico, que venha a apresentar atividade antipsoriática otimizada e reduzindo os efeitos adversos, comparativamente a terapia convencionalmente utilizada na atualidade.

3. DESENVOLVIMENTO

A modificação molecular é uma alternativa para a otimização da atividade dos fármacos. As modificações envolvem alterar as características físico-químicas, toxicológicas, farmacológicas, farmacocinéticas e organolépticas da molécula. O processo que incorpora um transportador à molécula ativa para que seja possível atravessar as barreiras biológicas, e que *in vivo* sofre biotransformação (química ou enzimática) liberando a subunidade ativa, é a latenciação (WERMUTH, 1994; TESTA, 2004; BUNDGAARD,1992; BUNDGAARD,1991).

A latenciação é o processo que leva à formação dos pró-fármacos. Os pró-fármacos surgiram como alternativa para a melhoria da terapêutica. A modificação molecular é um campo promissor, visto que pode aumentar a biodisponibilidade, solubilidade, seletividade, absorção, reduzir os efeitos adversos e a toxicidade de um fármaco. O pró-fármaco teoricamente é uma molécula farmacologicamente inativa, necessitando sofrer uma biotransformação para que libere a forma ativa (WERMUTH, 1994; TESTA, 2004; BUNDGAARD,1992; BUNDGAARD,1991; CHUNG et al, 2005).

Para o planejamento de novas moléculas é necessário salientar alguns pontos, como: mecanismos do organismo capazes de ativar o pró-fármaco, estabilidade química, grupos funcionais da molécula capazes de sofrer derivatização e toxicidade. Além de que, para um planejamento bem sucedido os pesquisadores devem conhecer bem o alvo que deseja atingir, os sistemas enzimáticos, os fluídos biológicos e seu pH e as barreiras que pode encontrar (SILVA, 2001).

Os pró-fármacos podem ser subdivididos em: pró-fármacos clássicos, bioprecursores, mistos e fármacos dirigidos (WERMUTH, 1984). Os pró-fármacos clássicos são os que, por definição, seguem o que é o processo de latenciação, isto

é, há a incorporação de um transportador (sem atividade biológica) adequado ao fármaco, o que torna a molécula inativa ou menos ativa, mas que permite atravessar as barreiras biológicas e melhorar a atividade terapêutica. Para liberar a subunidade ativa necessita sofrer hidrólise química ou enzimática (CHUNG et al., 2005).

Os bioprecursores são fármacos latentes, ou seja, não possuem ação e nem um transportador acoplado, mas ao sofrer biotransformação liberam um metabólito ativo no organismo. O enalapril é um exemplo de um bioprecursores (WERMUTH, 1994).

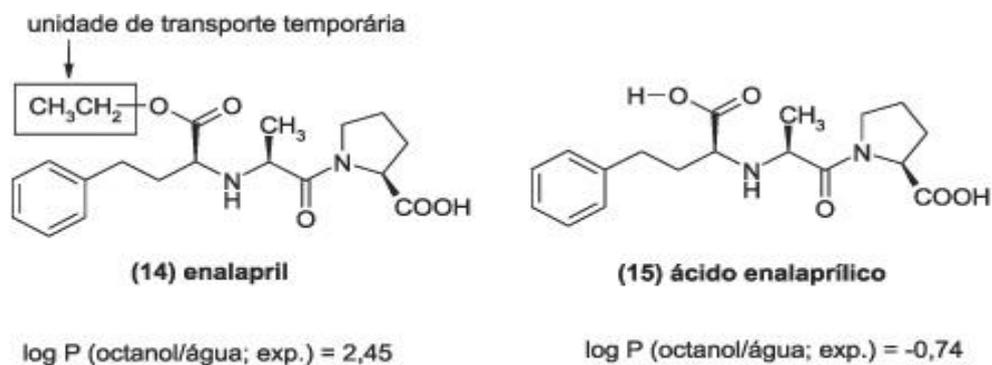


Figura 6: Biotransformação do enalapril. (PEREIRA, 2006)

Os pró-fármacos mistos misturam as características dos bioprecursores e dos pró-fármacos clássicos. É uma molécula que precisa sofrer uma série de reações químicas no organismo para que possa se ativar. Bodor e Abdelalim (1985) propuseram um sistema de liberação, o CDS (*Chemical Delivery System*). Esse sistema atravessa a barreira hematoencefálica e sofre uma primeira biotransformação, oxidando o transportador (positivando-o). Essa forma acumula-se no sistema nervoso central onde sofre uma segunda biotransformação liberando o fármaco ativo (BODOR; ABDELALIM, 1985).

Já os fármacos dirigidos representam uma subdivisão dos pró-fármacos no qual, o transportador utilizado é específico para certo receptor ou enzima presente no sítio de ação do fármaco. Isso torna a molécula mais seletiva, reduz a ação em

outros órgãos ou tecidos e, conseqüentemente, diminui os efeitos adversos (CHUNG et al., 2005).

Há outra classe em que os transportadores podem desenvolver atividade terapêutica no organismo quando bioativado o pró-fármaco, neste caso são chamados de pró-fármacos recíprocos. Esse tipo de molécula permite que se consiga uma ação mista ou atividade única por mecanismos diferentes em uma única molécula (SINGH, G.; SHARMA, 1984; WERMUTH, 1992; CHUNG, 1998). A sulfasalazina é um dos principais exemplos a ser citado; esse medicamento foi introduzido na terapêutica antes mesmo do conhecimento do conceito de pró-fármaco recíproco. Inicialmente era indicado para o tratamento de artrite reumatóide, mas descobriu-se que quando metabolizada no organismo pelas azo-redutases libera duas moléculas farmacologicamente ativas, a sulfapiridina (antibacteriano) e o ácido aminossalicílico (anti-inflamatório). Atualmente é indicada no tratamento de colite ulcerativa.

Visto que a psoríase possui diferentes mecanismos que podem ser controlados, a elaboração de um pró-fármaco recíproco torna-se interessante devido ao seu efeito somatório. Além de ser uma doença imunomodulada, apresenta sintomas inflamatórios, alvos potenciais a explorar no seu controle.

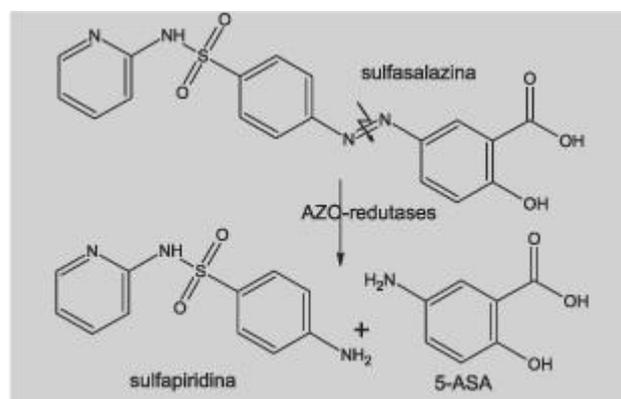


Figura 7: Pró-fármaco recíproco de sulfapiridina e ácido aminossalicílico (5-ASA) (KOROLKOVAS, 1984.)

Seguindo essa linha, a talidomida, fármaco utilizado com a finalidade hipnótica-sedativa, possui também atividade anti-inflamatória, mas devido a teratogenicidade decorrente de um dos seus isômeros deixou de ser utilizada. Verificou-se que seu potencial anti-inflamatório era decorrente da modulação da produção dos níveis de TNF- α , e a parte ftalimídica da molécula era a responsável por essa ação (COLLIN et al., 2001).

O fator de necrose tumoral alfa é a citocina pró-inflamatória produzida por quase todos os mediadores da resposta imunológica da psoríase. Sua produção está ligada aos queratinócitos, as células dendríticas, as células dendríticas inflamatórias e aos linfócitos Th1 e Th17 (SANCHEZ, 2010). Ele se destaca devido ao seu potencial pró-inflamatório, sua participação direta no início da resposta imune e efeito nos queratinócitos, estimulando sua hiperproliferação, e no endotélio aumentando a adesão de moléculas no vaso sanguíneo e o seu crescimento. Isso o leva a ser um ótimo alvo a ser explorado para o controle da psoríase (ARRUDA, 2004).

Estudos demonstraram que modificações na estrutura da talidomida, mantendo a base ftalimídica podem desempenhar a mesma ação antiinflamatória, sem causar teratogenicidade. De modo que, os derivados ftalimídicos podem desempenhar um papel anti-inflamatório importante na inibição da expressão do fator de necrose tumoral alfa (COLLIN et al., 2001). Em outras palavras, estudos entre a relação estrutura química e a atividade biológica (REA) destacam o grupamento químico ftalimídico como essencial para atividade de inibição de TNF- α (LIMA et al., 2001) e que também, a inibição desta citocina resulta em efeitos analgésicos periféricos (RIBEIRO, 2000); compostos ftalimídicos que inibam essa citocina poderiam auxiliar no tratamento da psoríase. Neste sentido, no

planejamento estrutural considerou-se os relatos da literatura sobre a REA de inibidores de TNF- α , que mostram que a inibição desta citocina é maior quando o núcleo ftalimídico está diretamente ligado a um anel aromático, vislumbrando adequada funcionalização de acoplamento entre as duas moléculas de ftalimídica e metotrexato (LIMA, et al., 2001).

O metotrexato possui mecanismos já bem esclarecidos, é um fármaco utilizado sistemicamente no tratamento das formas mais graves da psoríase (eritrodérmica, artropática e pustulosa) (MARTIN; ARRUDA, 2004), age em queratinócitos em proliferação, porém atua mais significativamente como agente imunossupressor pela inibição da síntese de DNA em células imunocompetentes (JEFFES et al., 1995).

A administração tópica vem a ser uma alternativa, tendo em vista a redução dos efeitos adversos pelo uso crônico de forma sistêmica. O uso tópico do metotrexato atua, principalmente, nos queratinócitos em rápida divisão, reduzindo a formação de lesões, mas também na diminuição da inflamação da pele. Combinado com o derivado ftalimídico, inibidor de formação de TNF- α , a potência do fármaco aumentaria de forma sinérgica.

Os derivados recíprocos se tornam muito úteis na terapêutica por poderem ter efeito aditivo, que resulta da ligação de fármacos que podem ser liberados no local de ação em tempos iguais e agem por meio de mecanismos de ação diferentes, atuando em vias diferentes do processo patológico, prevenindo o surgimento de rotas bioquímicas alternativas de escape ou diminuindo a toxicidade em relação às células normais.

Comportando-se como pró-fármaco, o composto proposto obrigatoriamente tem de liberar o metotrexato e a ftalimida. Tal liberação pode se dar de forma

controlada e por meio da ação enzimática, ocasionando ação prolongada pela liberação paulatina dos fármacos, possibilitando administração em intervalos mais longos de tempo e a menores doses em relação aos fármacos simples.

Em suma, ao se planejar e obter este pró-fármaco recíproco, pela junção de derivado ftalimídico com a molécula do metotrexato atuaria em vias diferentes promovendo a soma de mecanismos de ação, agindo nas vias antiproliferativa, imunomoduladora e anti-inflamatória, da doença. Poderá promover seu uso de forma tópica, reduzindo o surgimento de efeitos adversos, uma vez que sistemicamente todos os medicamentos para o controle da psoríase, devido ao seu uso contínuo, provocam série de problemas ao organismo. Desta forma promovendo ao paciente um tratamento mais seguro, eficaz e com maior qualidade de vida.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações Gerais

Inicialmente, apresentamos alguns aspectos gerais das reações realizadas e, sendo este um trabalho de síntese em que se lança mão das técnicas de purificação, para obtenção dos compostos em adequado grau de pureza e, para as mais diversas análises dos compostos que permitem sua caracterização e identificação, neste sub-item as abordamos, como parte importante dos procedimentos realizados.

As sínteses realizadas neste trabalho são bem simples e de fácil execução. Deve-se atentar para garantir ao máximo a relação molar entre os reagentes (massa e (ou) volume) e as condições que a reação exige, para um maior rendimento.

A adição de água no ácido clorossulfônico deve ser bem cuidadosa, uma vez que ele é bem reativo perante a água, sendo adicionada aos poucos e bem gelada para reduzir a reatividade e o calor da reação.

O ambiente de nitrogênio na síntese do pró-fármaco deve ser bem controlado, além de garantir uma atmosfera inerte, o fluxo de nitrogênio deve ser lento para não arrastar o solvente da reação, que no caso é o diclorometano.

Todas as sínteses devem ser feitas em uma capela e com os equipamentos de proteção individual adequados, para evitar acidentes.

Técnicas analíticas

A *Cromatografia em camada delgada* consiste num método de separação de componentes de uma mistura sob uma fina camada de adsorvente retido numa superfície plana e lisa, pela passagem de um solvente. Os adsorventes, ou fases estacionárias, mais utilizadas são a sílica, a alumina, a celulose e a poliamida. Já a

fase móvel é composta, geralmente, por misturas de solventes orgânicos que variam na sua polaridade.

Nesta técnica, prepara-se uma superfície plana com uma fina camada da fase fixa (adsorvente); nesta placa se aplicará micro-litros da amostra em alguns centímetros da borda e a eluição é feita em uma cuba saturada com a fase móvel. O eluente ascende na fase estacionária por força da capilaridade, separando os componentes da mistura em diferentes alturas da placa, de acordo com a natureza da molécula. A revelação pode ser feita em luz ultravioleta.

É uma técnica qualitativa de fácil execução e compreensão, demanda pouco tempo para ser realizada, é versátil, possui um baixo custo e grande reprodutibilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

A análise de *faixa de fusão* utilizada consistiu em inserir em um capilar de vidro fechado uma pequena quantidade da amostra sólida, esse capilar foi introduzido em um aparelho específico que aumentou gradativamente a temperatura da amostra e o analisador verificou a faixa de temperatura que a amostra levou para fundir. Quanto maior é esta faixa indica que mais impurezas há na amostra.

A *espectroscopia de infravermelho* é uma espectroscopia de absorção que se baseia no fato de que as ligações químicas possuem níveis de energia bem definidos e vibram em frequências específicas. Essas frequências estão relacionadas com a massa de átomos que constituem a molécula, seus níveis de energia e as ligações químicas.

O espectrofotômetro é um aparelho que incide um feixe de luz infravermelha (na região de 4000 a 400 cm^{-1}) na amostra sólida. Para a leitura da amostra prepara-se uma pastilha de KBr com a amostra. O aparelho faz a leitura e apresenta no leitor

as bandas de maior frequência, que de acordo com a literatura, em tal comprimento de onda, representa uma ligação química específica.

A *ressonância magnética nuclear (RMN)* é uma técnica experimental física, mas tem suas aplicações na química, biologia e medicina. É uma técnica analítica que permite obter informações estruturais e dinâmicas sobre a matéria. Baseia-se na detecção das propriedades magnéticas do núcleo. O núcleo de um átomo possui cargas que giram em torno do seu eixo gerando um campo magnético.

O aparelho de RMN funciona gerando um forte campo magnético, esse campo obriga os núcleos a se alinharem, uma vez que estão dispostos de forma aleatória. Após esse alinhamento emite-se uma radiação eletromagnética intensa na frequência de rádio. Os núcleos ao receberem essa energia “saltam” para outro nível energético, que ao retornar para a sua orientação original, liberam uma radiação característica. Essa radiação característica gera um sinal elétrico, que no aparelho é interpretado matematicamente e traduzido na forma de gráfico da intensidade do sinal pela frequência aplicada.

Apesar de nem todo núcleo emitir um campo magnético (como o ^{12}C), a maioria se comporta como pequenos magnetes (como o ^1H e o ^{13}C). Essa técnica permite identificar o número e os grupamentos em uma amostra, sendo fundamental para a obtenção da informação da estrutura das moléculas.

Na técnica de validação, efetuou-se o doseamento construindo uma curva padrão, para isso preparam-se um mínimo de cinco amostras em concentrações sucessivas. O produto é solúvel em solventes alcalinos, portanto, solubiliza-se o fármaco em solução de hidróxido de sódio 1,0M. Para realização das diluições e obtenção de melhores resultados é indicado manter um padrão em relação à

vidraria, utilizando o mesmo fabricante, pipeta e balão volumétrico individuais para cada diluição.

No espectrofotômetro calibra-se o aparelho com a solução padrão, para que seja feito a varredura do comprimento de onda de melhor absorção. Feito isso, determina-se a curva padrão pela leitura das absorbâncias das diluições em qualquer uma das faixas de melhor absorção pré-determinadas. A curva padrão serve como referência de concentração em relação à absorbância obtida na amostra. A validação deve garantir algumas exigências:

Técnicas de purificação

Para a filtração sob pressão reduzida é necessário um kitasato, um funil de Buchner, papel de filtro, mangueira e uma bomba de vácuo. A remoção do solvente por esse método se dá de forma mais eficiente e rápida. Havendo a retenção do sólido no papel de filtro e a coleta do filtrado no kitasato.

A recristalização é um método simples de purificação de compostos sólidos. Consiste em dissolver o sólido em um solvente quente e logo após submeter essa solução a um resfriamento lento. Em baixas temperaturas a solubilidade do sólido dissolvido diminui e ele começa a separar da solução em forma de cristais, sendo que as impurezas ficam no solvente. Porém quando há um resfriamento rápido a formação do núcleo do cristal irá carregar algumas impurezas, formando o que é chamado de precipitado.

A separação dos cristais da solução é feita por uma filtração simples, sendo que a filtração a vácuo é mais eficiente e rápida.

4.1. Materiais de síntese

Água destilada, anidrido ftálico (J.T. Baker®); etanol (Chemis®); diclorometano (Merck®), trietilamina (Merck®), anilina (Synth®); ácido clorossulfônico (Vetec®); metanol (Chemis®); metotrexato (Genix®).

4.2. Métodos de síntese

4.2.1. *Síntese dos derivados ftalimídicos*

4.2.1.1. Síntese do ácido 2-fenil-1H-isoindol-1,3 (2H) diona (SANTOS et al., 2006)

A um balão de 10,0 mL adicionou-se 0,50 g (3,31mmol) de anidrido ftálico e 2,00 mL de anilina. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por 1 hora em banho de óleo mineral. Após esse período, resfriou-se e transferiu-se a mistura pastosa para um erlenmeyer, adicionando em seguida etanol q.s.p., solubilizou-se a quente e cristalizou-se o produto em banho de gelo.

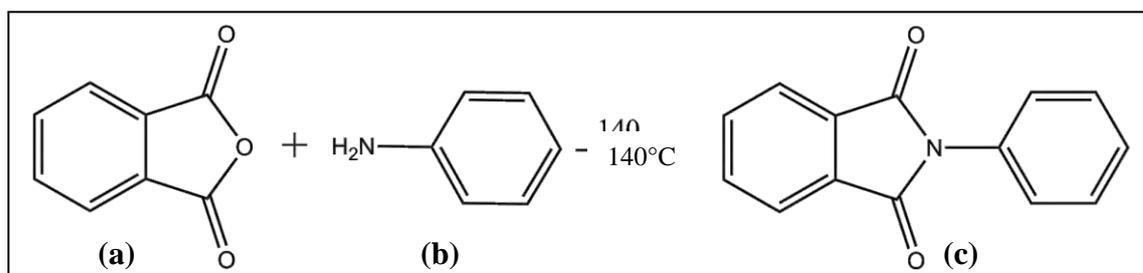


Figura 8 – Representação esquemática da reação de obtenção do 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona. Anidrido ftálico (**a**), anilina (**b**), 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (**c**).

4.2.1.2. Síntese do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil (adaptado de LIMA et al., 2002)

A uma solução de 0,16 g (1,35 mmol) de ácido clorossulfônico mantida previamente sob agitação a temperatura ambiente por 10 minutos, adicionou-se, em pequenas porções, 0,15 g (0,67 mmol) de 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona. A suspensão resultante foi mantida sob agitação e aquecimento de 50°C por 30 minutos. Em seguida, resfriou-se a mistura reacional, adicionando-se mistura de gelo/H₂O (~20,00 mL) e filtrou-se o precipitado.

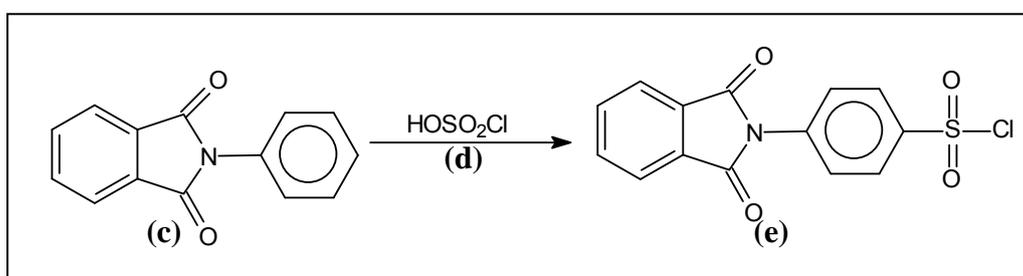


Figura 9 – Representação esquemática da reação de obtenção do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil. Ácido clorossulfônico (d), 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (c), cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil (e).

4.2.2. Síntese do pró-fármaco

Em um balão adicionou-se 297,00 mg (0,35 mmol) de metotrexato em 5,00 mL de diclorometano destilado. Em seguida, adicionou-se 0,05 mL de trietilamina. A mistura reacional foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida adicionou-se 149,00 mg (0,31 mmol) de cloreto 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil. A mistura reacional foi mantida sob agitação, a temperatura ambiente em atmosfera de nitrogênio por 2 horas. Em seguida, removeu-se o solvente à pressão reduzida e purificou-se o produto por cristalização.

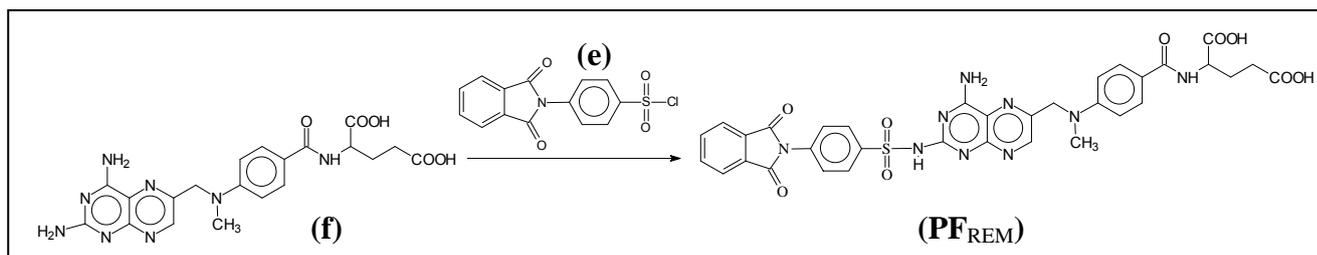


Figura 10 – Representação esquemática da reação de obtenção do pró-fármaco. Metotrexato (f), cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil pró-fármaco (e), pró-fármaco (PF_{REM})

4.3. Métodos analíticos

4.3.1. Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no IV, na região de 4.000 a 400 cm^{-1} , foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro de infravermelho FTIR-8300 da Shimadzu.

4.3.2. Espectrometria de ressonância magnética nuclear de carbono 13 e de hidrogênio (RMN ^{13}C e ^1H)

Os espectros de RMN ^{13}C e ^1H foram obtidos no espectrômetro Bruker, modelo DRX-300 (300 MHz) utilizando tubos de ressonância de 5 mm de diâmetro e solvente deuterado adequado do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-SP.

4.3.3. Faixas de fusão

As faixas de fusão dos compostos foram determinadas em aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific.

4.3.4. *Cromatografia em camada delgada (CCD)*

Cromatofolhas com sílica gel 60 F254, fase móvel de 70:30 (V:V) de clorofórmio e metanol como sistema eluente, iodo e luz ultravioleta como reveladores foram utilizados para realização da CCD no acompanhamento das reações e acompanhamento da purificação dos derivados sintetizados.

4.4. Métodos de purificação

4.4.1. *Destilação de solvente à pressão reduzida*

A remoção de solvente à pressão reduzida, a temperatura variáveis segundo o solvente removido foi efetuada em aparelho rotaevaporador MA280.

4.4.2. *Recristalização*

Os compostos foram recristalizados utilizando etanol como solvente.

4.5. Validação da metodologia analítica

Esse estudo foi feito para quantificar o produto sintetizado por espectrofotometria de UV-visível. Para isso os parâmetros avaliados foram a linearidade, a precisão, o limite de detecção, o limite de quantificação e a exatidão.

4.5.1. *Linearidade*

Demonstra se os resultados obtidos, dentro de um intervalo específico, são diretamente proporcionais à concentração do analito da amostra. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) é igual a 0,99 (BRASIL, 2003).

A linearidade é estabelecida com cinco concentrações sucessivas e diferentes da amostra, em triplicata. A leitura das amostras foi realizada no espectrofotômetro de ultravioleta. As concentrações preparadas para a construção da curva padrão foram de 20,0 µg/mL, 10,0 µg/mL, 5,0 µg/mL, 2,5 µg/mL e 1,0 µg/mL em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M.

4.5.2. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, e é estabelecida com, no mínimo, nove determinações dentro do intervalo estabelecido, em concentração baixa, média e alta (triplicata para cada). A precisão pode ser expressa como coeficiente de variação (CV%) e seus valores devem ser inferiores a 5% (BRASIL, 2003). As concentrações utilizadas para esse método foram de 20,0 µg/mL, 5,0 µg/mL e 1,0 µg/mL em hidróxido de sódio 1M.

A precisão é calculada pela equação:

$$CV(\%) = (DP/CMD) \times 100$$

CV – Coeficiente de variação; DP – Desvio padrão; CMD – Concentração média determinada (CMD = concentração/absorbância)

4.5.3. Limite de detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. A determinação é feita pela seguinte equação (BRASIL, 2003):

$$LD = DP_b \times 3 / IC$$

DPb - Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração; IC é a inclinação da curva de calibração.

4.5.4. Limite de quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis pela ANVISA sob as condições experimentais estabelecidas. É calculada pela seguinte equação (BRASIL, 2003):

$$LQ = DPb \times 10 / IC$$

DPb - Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração; IC é a inclinação da curva de calibração.

4.5.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro esperado. É calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, pela ANVISA, acrescida dos intervalos de confiança. (BRASIL, 2003)

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta (20, 5 e 1 µg/mL em NaOH 1M), com três réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente: (BRASIL, 2003)

$$\text{Exatidão} = (\text{concentração média experimental} / \text{concentração teórica}) \times 100$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese dos derivados ftalimídicos

Para a ação anti-inflamatória e imunomoduladora desejada do derivado ftalimídico, é fundamental a proteção desse grupamento frente às reações indesejadas.

5.1.1. Síntese do 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona - Produto c (Fig. 8)

A obtenção de 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (c) foi baseada na metodologia descrita por Lima e colaboradores (2002), sendo uma reação que se inicia com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre da amina da anilina à carbonila do anidrido ftálico, que sustenta uma carga parcial positiva (δ^+). Com a quebra da ligação π , o par de elétrons foi mantido pelo átomo de oxigênio, que ao restabelecer a ligação, promoverá a quebra da ligação C-O. O par de elétrons da amina realiza outro ataque ao carbono carbonílico. Há nova hidrólise de outra ligação π que, ao ser restabelecida, eliminando molécula de água, gerando o fechamento do anel, e formando o derivado fenil-ftalimídico.

Observou-se que o produto se cristalizou facilmente, apenas com banho de gelo que foi filtrado sob pressão reduzida para separar o produto de interesse do etanol e impurezas.

Os cristais obtidos foram analisados, mostrando coloração de branco a amarelo pardo, com rendimento percentual de 47%, faixa de fusão de 200-206°C. O produto mostrou-se solúvel em DMSO

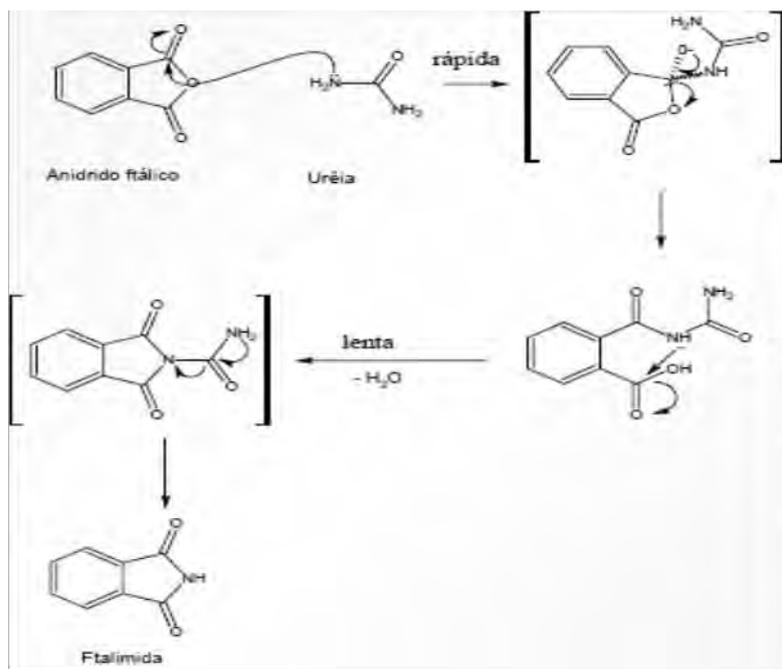
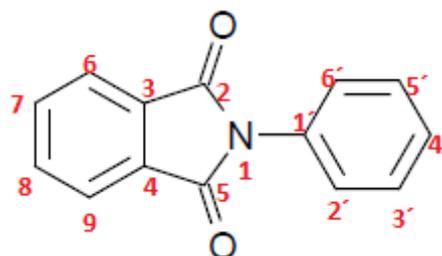
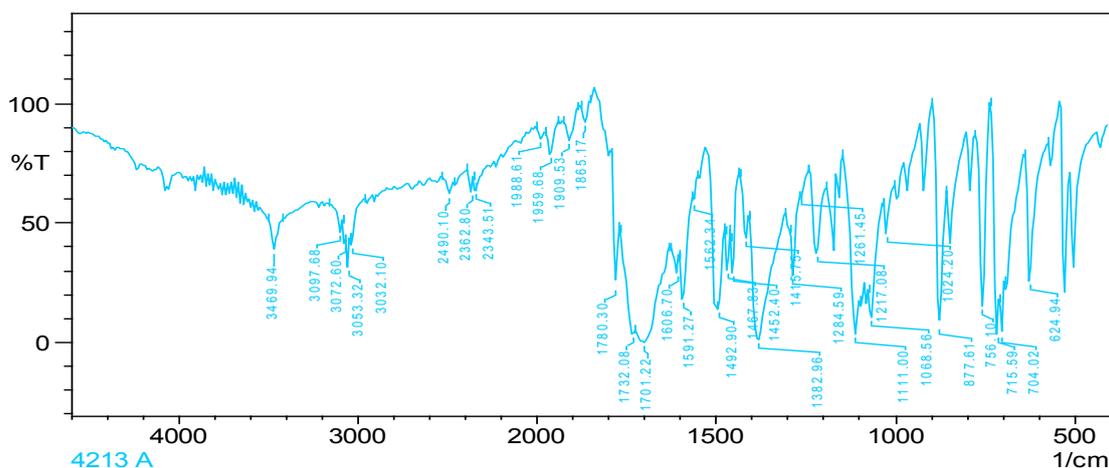


Figura 11 – Mecanismo de ação de formação da 2-fenil-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (SANTOS, 2007).

Identificação estrutural:



A análise de espectroscopia de absorção no infravermelho (espectro 1) mostrou em: 3053 cm^{-1} (ν C-H de aromáticos); 1780 cm^{-1} (ν C=O de imida); $1606,70\text{ cm}^{-1}$, 1500 cm^{-1} e $1452,4\text{ cm}^{-1}$ (ν C=C aromático) 1492 cm^{-1} (ν N-C-O); 1382 cm^{-1} (ν C-N-C) cm^{-1} . Visualiza-se os estiramentos axiais das carbonilas do sistema imídico como os sinais: 1780 cm^{-1} e 1706 cm^{-1} .



Espectro 1: Espectroscopia de absorção no infravermelho do derivado ftalimídico (Produto c).

A síntese e a caracterização estrutural da fenilftalimida já haviam sido descritas na literatura (LIMA et al., 2002). O acompanhamento reacional por CCD mostrou a formação de um novo produto.

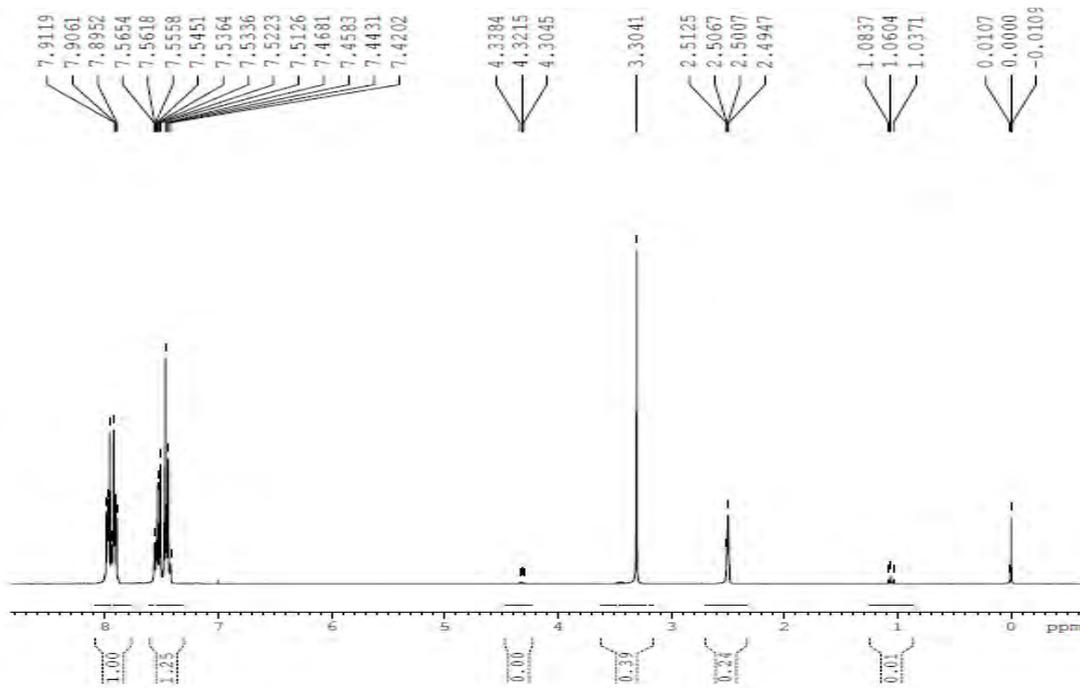
A obtenção dos derivados ftalimídicos arílicos é de fundamental importância, haja vista que relatos da literatura apontam que esses derivados substituídos são mais potentes na inibição de TNF-alfa que os derivados alquílicos (LIMA, et al 2001).

No espectro de RMN¹H (espectro 2) pode-se observar os hidrogênios do sistema aromático imídico em δ 7,89 e δ 7,91, respectivamente, os hidrogênios: H7,H8 e H6,H9. Nos deslocamentos de δ 7,43 e δ 7,51, podemos observar os hidrogênios do sistema aromático fenílico, referentes, respectivamente, aos hidrogênios H2', H3', H4' e H5', muito embora não haja integração desses hidrogênios para completo entendimento estrutural.

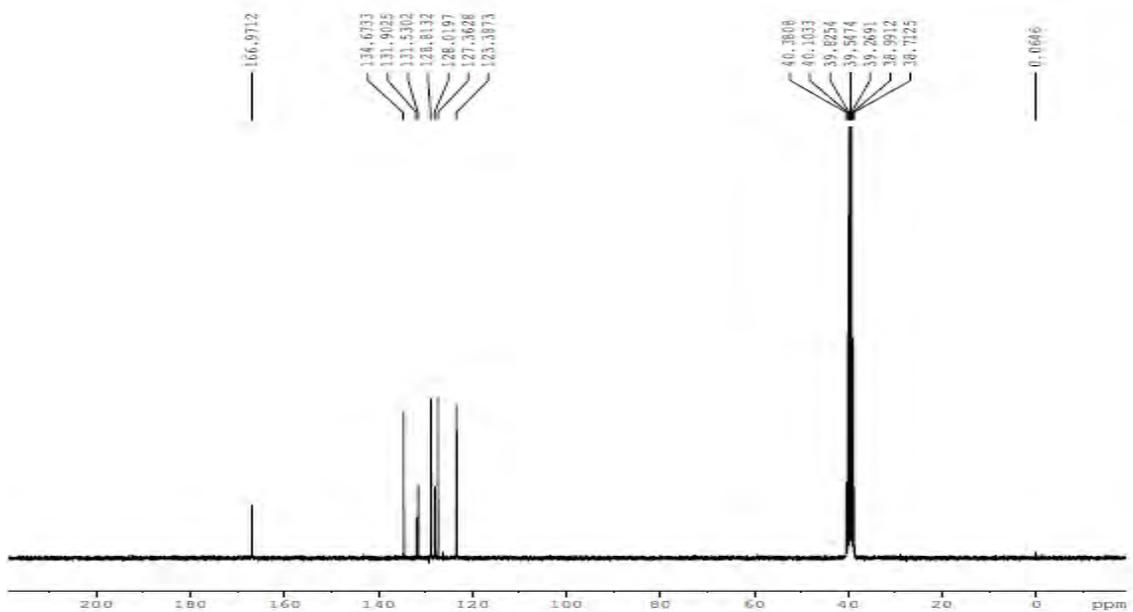
Por meio do espectro de RMN¹³C pode-se observar todos os deslocamentos químicos referentes aos carbonos presentes na molécula (produto c). As atribuições dos C-H aromáticos foram baseadas em dados da literatura (LIMA, 2001). No espectro 3, observam-se os deslocamentos químicos do C-3 em 131,90 ppm; e C-4

em 123,38 ppm. Observa-se também os deslocamentos químicos dos carbonos do sistema aromático imídico em 131,53 ppm; 128,01 e 134,67 ppm.

Esses resultados permitem afirmar que o composto fenilftalimida (produto c), foi obtido com sucesso.



Espectro 2: Espectroscopia de RMN¹H do derivado ftalimídico (Produto c).



Espectro 3: Espectroscopia de RMN¹³C do derivado ftalimídico (Produto c).

5.1.2. Síntese do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil - Produto e(Fig 9)

Esta etapa consiste em adicionar um grupamento mais reativo para a proteção da ftalimida. A função da adição do cloro foi esta, devido a sua eletronegatividade, ele torna-se num excelente protetor.

Ao final da reação, o rendimento foi de 30%. O isolamento foi feito por resfriamento do meio reacional, seguido de adição de gelo/H₂O gelada e filtração do precipitado formado, em funil de Büchner, sólido de cor branca e faixa de fusão 180-187 °C que se mostrou solúvel em DMSO. Essa reação foi acompanhada por CCD, e pode-se observar a formação de um único produto que possuía R_f diferente da fenilftalimida (Produto c).

O mecanismo de reação de formação deste composto envolveu substituição eletrofílica aromática, em que o sistema de elétrons π aromático atacou o enxofre do ácido clorossulfônico que sustenta uma carga parcial positiva (δ^+), formando na 1ª etapa intermediário energético, devido à quebra da ressonância do aromático. Na 2ª etapa, o íon arênio perdeu um próton, restabeleceu a ressonância e formou o íon ftalilbenzeno sulfonato. Nas etapas seguintes, os pares de elétrons do oxigênio atraem prótons de moléculas de ácido, presentes no meio reacional. Há formação de um bom grupo abandonador. Na última etapa, uma molécula de cloreto, presente no meio reacional atacou o enxofre, e levou à eliminação de uma molécula de água.

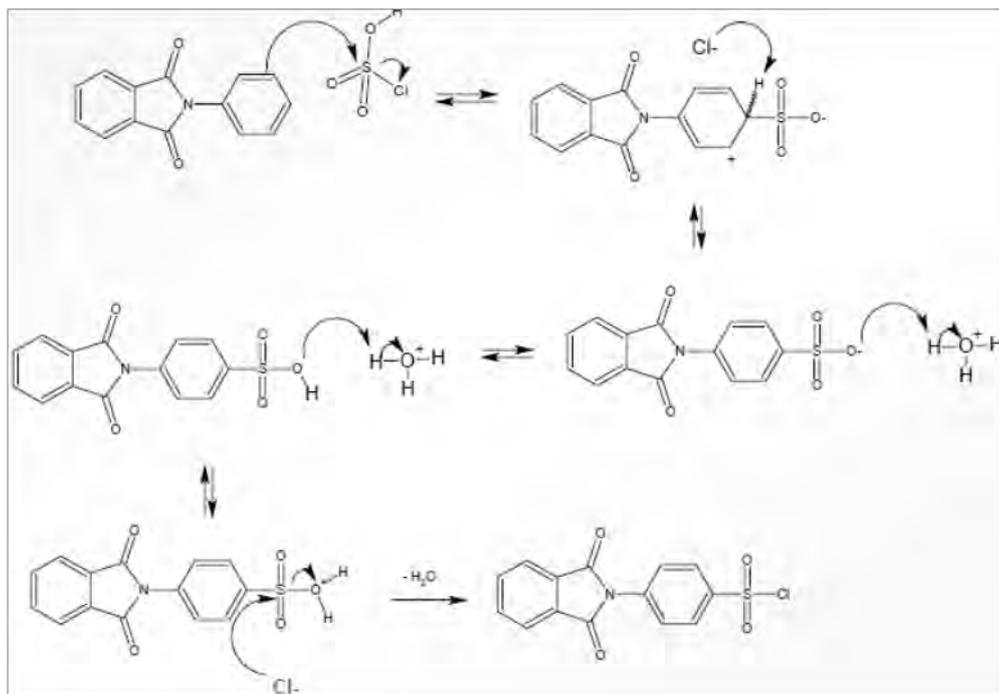
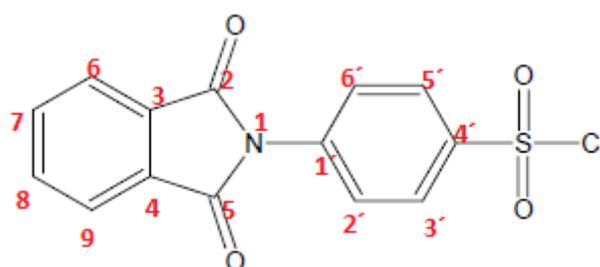
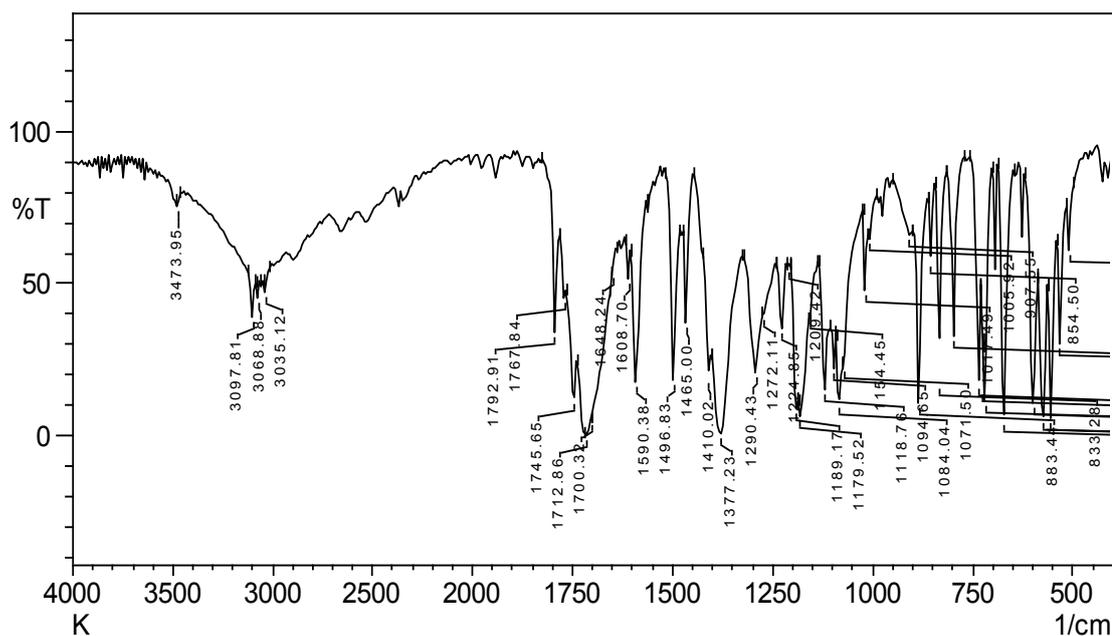


Figura 12 – Mecanismo de ação para a formação do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil (SANTOS, 2007)

Identificação estrutural:

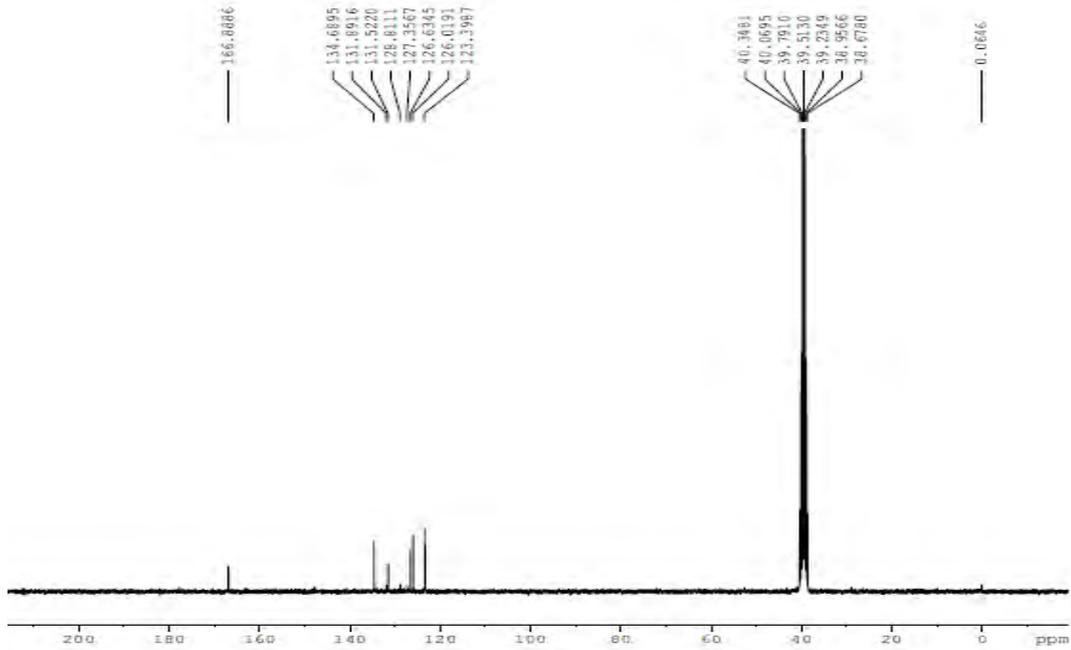


Por meio do espectro de absorção no infravermelho (espectro 4) foi possível fazer as seguintes atribuições: ν C-H de aromáticos $3097,81\text{ cm}^{-1}$; ν C=O imida: 1792 cm^{-1} e $1745,65\text{ cm}^{-1}$; ν C=C aromático: 1590 cm^{-1} ; ν N-C-O $1496,83\text{ cm}^{-1}$; ν C-N-C 1377 cm^{-1} ; ν S=O $1179,52\text{ cm}^{-1}$. Verifica-se os estiramentos das carbonilas da imida em 1792 cm^{-1} e $1745,65\text{ cm}^{-1}$, e ausência de estiramentos axiais de C=O de amida e/ou ácido carboxílico, graças ao sistema ftalimídico íntegro. Em $1179,52\text{ cm}^{-1}$ há um estiramento axial referente a ligação S=O da nova subunidade introduzida.

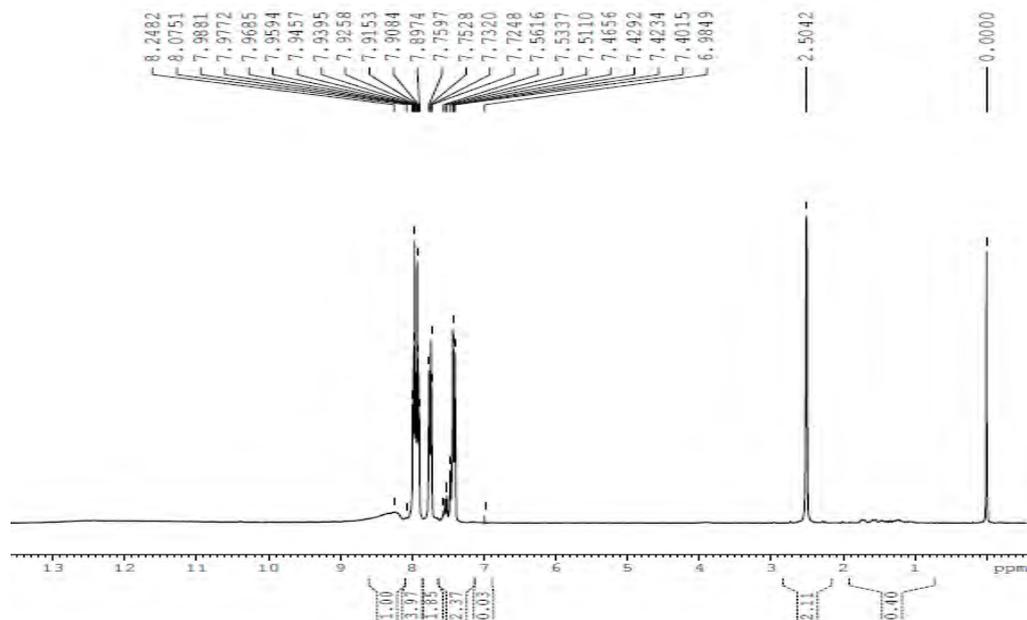


Espectro 4: Espectroscopia de absorção no infravermelho do derivado ftalimídico (Produto e).

O espectro 5 de ressonância magnética nuclear de carbono mostrou o carbono 4', em que está ligada a subunidade cloreto de sulfonila. Na fenilftalimida (produto c) esse carbono apresentou um deslocamento químico de δ 128,01, após a introdução da nova subunidade seu deslocamento químico passa a ser δ 134,8 devido ao efeito de desproteção causado pela presença da subunidade eletronegativa. O mesmo fenômeno de desproteção observa-se no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Espectro 6) com a introdução desta nova subunidade, principalmente naqueles hidrogênios vizinhos ao cloreto de sulfonila. Os hidrogênios 3' e 5' por exemplo, apresentavam deslocamento químico δ 7,44 na fenilftalimida, e após a reação passaram a apresentar δ 7,759. Essa desproteção ocorreu pelo efeito indutivo eletroatrator dessa subunidade introduzida.



Espectro 5: Espectroscopia de RMN¹³C do derivado ftalimídico (Produto e).



Espectro 6: Espectroscopia de RMN¹H do derivado ftalimídico (Produto e).

5.2. Síntese do Pró-fármaco

A síntese final visou ligar o metotrexato na molécula do derivado ftalimídico. Para isso, a etapa anterior foi fundamental para essa ligação, o grupamento sulfonila

com o átomo de cloro direcionou a reação para que ela aconteça com a amina livre do metotrexato. O enxofre do grupo sulfonila por possuir uma carga parcial positiva (δ^+) foi suscetível a ataques nucleofílicos. Com isso, o par de elétrons da amina livre do metotrexato atacou o enxofre deslocando uma carga negativa para o oxigênio, dessa forma a ligação π foi quebrada. Ao refazer a ligação π o cloro foi eliminado, formando um intermediário com o nitrogênio positivado. Por fim, uma base (íon cloreto) desprotona a molécula retirando um hidrogênio.

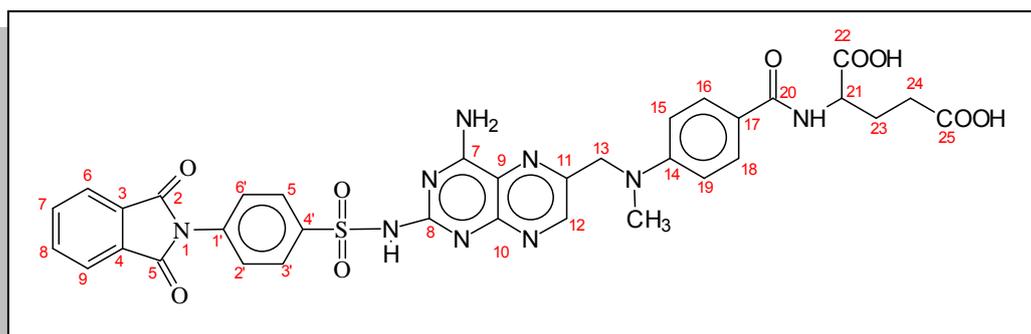
Ao final da reação o produto se mostrou totalmente solúvel em DMSO e DMF, sendo que foi feita uma purificação com a adição de ácido acético glacial e evaporando o solvente à pressão reduzida no rotaevaporador.

Tabela 1: Solubilidade do pró-fármaco.

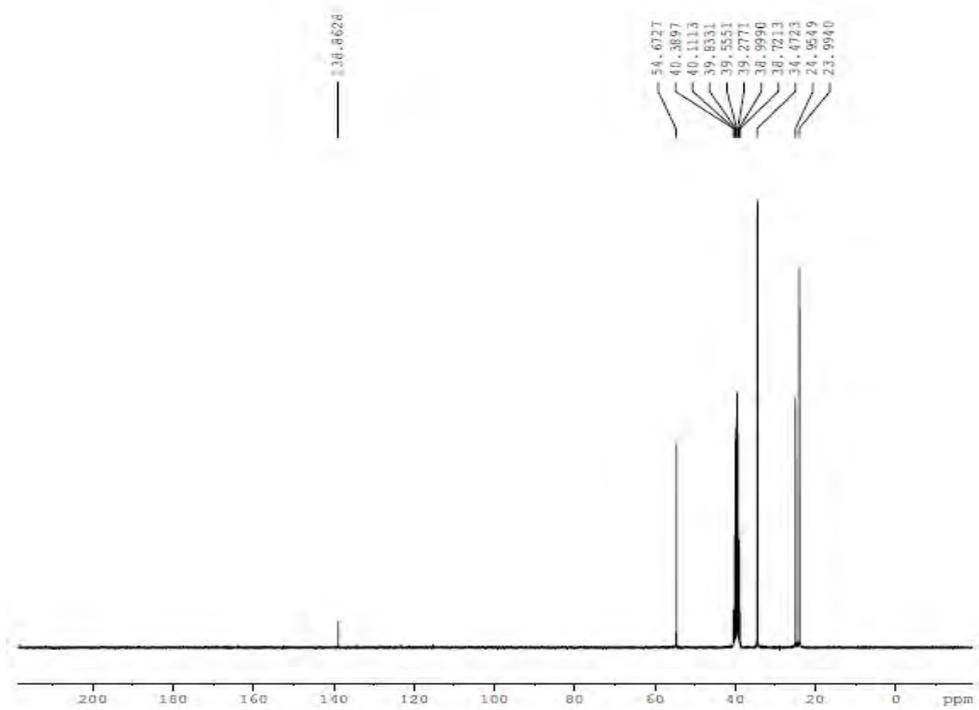
Solvente	Solubilidade
Hexano	Insolúvel
Clorofórmio	Insolúvel
Diclorometano	Insolúvel
Acetona	Insolúvel
Dimetilsulfóxido	Solúvel
Dimetilformamida	Solúvel
Acetato de etila	Pouco solúvel
Etanol	Praticamente insolúvel

Metanol	Pouco solúvel
Ácido acético	Muito solúvel
Água	Pouco solúvel

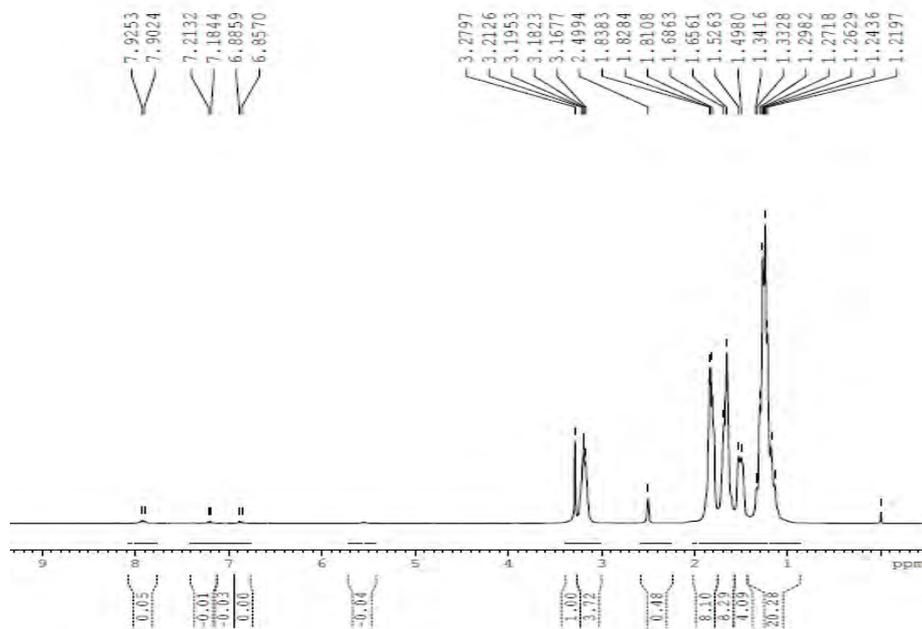
Identificação estrutural:



A cor, a viscosidade do meio reacional, o perfil cromatográfico, a faixa de fusão, a solubilidade, etc, sugeriram obtenção do composto desejado, na análise de RMN¹³C e RMN¹H (espectros 7 e 8) não se observou todos os deslocamentos químicos referentes aos átomos formadores da molécula, mas aqueles detectados remetem ao pró-fármaco. Como caracterizado na análise de RMN¹³C do cloreto de 4-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)benzenosulfonil, observa-se deslocamentos químicos do C-3 em 138,86 ppm, do carbono fenílico (C1') que se liga ao nitrogênio imídico em 40,38 ppm, carbono, do carbono metilênico do MTX em 54,86 ppm e carbono metílico em 24,95 ppm. No espectro de RMN¹H pode-se observar o hidrogênio das aminas primárias em δ 3,28 e 3,16, hidrogênio da metila em δ 1,26 e o hidrogênio das aminas secundária em δ 1,52 e 1,68. Os hidrogênios correspondentes a anéis podem ser observados em δ 7,90, 7,21 e 6,88.



Espectro 7: Espectroscopia de RMN¹³C do Pró-fármaco (PF_{REM}).



Espectro 8: Espectroscopia de RMN¹H do Pró-fármaco (PF_{REM}).

5.3. Validação do método analítico

Para a construção da curva padrão, primeiramente, realizou-se uma varredura de comprimento de onda no espectrofotômetro UV-visível, para verificar os picos de maior absorção do produto. Os valores encontrados estavam nos comprimentos de onda de 364nm, 300nm e 257nm. O comprimento de onda utilizado para a validação foi de 257nm, pois era o pico com maior absorção do produto.

A validação estuda através de testes uma metodologia que permitirá quantificar o produto sintetizado de forma confiável.

Linearidade

Com testes realizados determinou-se que a faixa com as melhores concentrações para a análise foi de 20,0µg/mL, 10,0µg/mL, 5,0µg/mL, 2,5µg/mL e 1,0µg/mL. Pois estas concentrações abrangem o melhor intervalo para a leitura das absorbâncias. Os resultados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Relação concentração teórica e absorbância.

Concentração teórica (µg/mL)	Absorbância Amostra 1	Absorbância Amostra 2	Absorbância Amostra 3	Média das absorbâncias
20,0	0,848	0,888	0,865	0,867
10,0	0,469	0,412	0,432	0,437
5,00	0,254	0,263	0,229	0,248
2,50	0,153	0,187	0,168	0,169
1,00	0,076	0,098	0,090	0,088

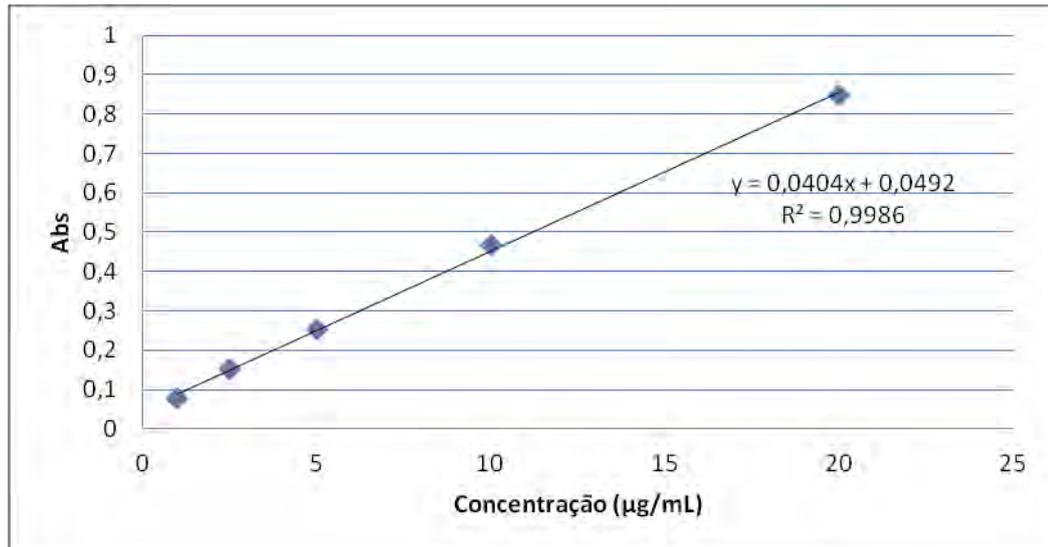


Figura 13: Gráfico da curva padrão e linearidade

Pelo gráfico (figura 13) estabeleceu-se uma relação entre concentração do pró-fármaco e absorbância, sendo que o valor do coeficiente de correlação (R^2) da reta é igual a 0,9986, o que indica ele garante a sua linearidade.

Limite de detecção e de quantificação

Para estabelecer os limites de detecção e de quantificação foi necessário estabelecer a equação da reta ($y = ax + b$) de três curvas padrão, para a determinação do coeficiente angular (a) e do intercepto (b) médios. A tabela 3 abaixo mostra os valores obtidos:

Tabela 3:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média
Coeficiente angular (a)	0,0404	0,0404	0,0405	0,0404
Intercepto (b)	0,0492	0,0584	0,0453	0,0509

Para o cálculo do limite de detecção e quantificação, utilizou-se o desvio padrão médio (Dpb) do intercepto (b) em y e o valor obtido foi 0,006726316. O valor

do limite de detecção encontrado foi de 0,499067175 e o de quantificação foi de 1,663557249.

Precisão

A precisão foi medida com concentrações de 20,0 µg/mL (alta), 5,0 µg/mL (média) e 1,0 µg/mL (baixa) em solução de NaOH 1M. Para o cálculo do coeficiente de variação (CV%), foi necessário calcular a concentração média determinada (CMD = concentração/absorbância) e o desvio padrão do CMD. Os resultados obtidos estão nas tabelas 4 e 5:

Tabela 4:

Concentração do produto	Absorbância Amostra 1	Absorbância Amostra 2	Absorbância Amostra 3	Absorbância média
20,0 µg/mL	0,942	0,860	0,879	0,887
5,0 µg/mL	0,268	0,263	0,245	0,258
1,0 µg/mL	0,078	0,085	0,079	0,080

Tabela 5: Concentração média determinada (CMD), desvio padrão e coeficiente de variação (CV%) das amostras.

Concentração do produto	CMD amostra 1	CMD amostra 2	CMD amostra 3	Desvio padrão	CV(%)
20,0 µg/mL	21,6450	23,2558	22,7531	0,824114	3,6545
5,0 µg/mL	18,6567	19,0114	20,4081	0,925949	4,7831
1,0 µg/mL	12,8205	11,7647	12,6582	0,568542	4,5796

De acordo com os cálculos, os valores do coeficiente de variação foram adequados, pois para cada concentração o valor ficou abaixo de 5% recomendado pela ANVISA.

Exatidão

Nas concentrações de 20,0 µg/mL (alta), 5,0 µg/mL (média) e 1,0 µg/mL (baixa) em solução de NaOH 1M, em triplicata os resultados da exatidão estão descritos na tabela 6 a seguir:

Tabela 6: Exatidão da amostra do pró-fármaco.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração		
	determinada média (µg/mL)	Exatidão (%)	Desvio padrão
20,0	19,8646	99,3233	± 0,3611
5,0	5,1587	103,1746	± 0,2880
1,0	0,9203	92,0333	± 0,0897

As amostras demonstraram uma exatidão adequada, pois encontram-se no intervalo de 80 a 120% recomendado pela ANVISA.

6. CONCLUSÕES

A modificação molecular foi utilizada neste trabalho por meio da latenciação para se obter um derivado do metorexato e ftalimida que conjugasse em única molécula as propriedades antiproliferativa, anti-inflamatória, e moduladora de TNF- α . Esta nova entidade química (NCE) quando no organismo humano rompe a ligação que os une, caracterizando-se tal qual como foi proposto, a síntese de um potencial pró-fármaco recíproco com atividade anti-psoríase.

A síntese foi bem sucedida, os derivados ftalimídicos e o composto final foram caracterizados por meio de análises espectrofotométrica de infravermelho, determinação da faixa de fusão e CCD, cuja comprovação efetivou-se por meio da espectrometria de ressonância nuclear de ^{13}C e ^1H .

Na validação do método analítico foi possível determinar os comprimentos de onda de maior absorção do produto e o intervalo de concentração em que melhor pode ser feita a validação. O doseamento do produto pode ser feito, pois verificou-se uma linearidade na curva padrão, portanto, foi possível estabelecer uma relação entre concentração do produto e a absorbância obtida.

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho não termina por aqui, a síntese do pró-fármaco foi apenas o começo. Serão necessários estudos para melhorar o rendimento da síntese do pró-fármaco, ensaios de ação antipsoriásica, verificando a inibição de TNF- α , a ação anti-inflamatória e antiproliferativa proposta para este fármaco. Além disso, estudos de permeação cutânea, liberação e toxicidade devem ser feitos para garantir o objetivo principal proposto pelo trabalho.

8. REFERÊNCIAS

ARRUDA, L.; YPIRANGA, S.; MARTINS, G.A. Tratamento sistêmico da psoríase. Parte 2: imunomoduladores biológicos. **An. Bras. Dermatol.**, v.79, n.4, p. 393-408, 2004.

ATAÍDE, D.S.T.; ESMANHOTO, L.D.K.; HELMER, K.A.; GUERRA, I.R.C.; GUIMARÃES, C.C.G.; MORITZ, S. Ulceração das placas psoriáticas: efeito cutâneo adverso do metotrexato em altas doses no tratamento da psoríase: relato de três casos. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 749-753, 2003.

BODOR, N.; ABDELALIM, A. M. Improved delivery through biological membranes XIX: novel redox carriers for brain-specific chemical delivery systems. **J. Pharm. Sci.**, v.74, p.241-245, 1985.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução – RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm#. Acesso: 19 ago. 2011.

BRITO, A.E. Psoríase. Disponível em: <http://medicinanet.com.br/conteudos/revisoes/1598/psoriase.html>. Acesso: 22 set. 2009.

BUNDGAARD, H. Design and applications of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; BUNDGAARD, H. (Ed). *A Textbook of drug design and development*. Oxford: Academic, 1991. p. 113-191.

BUNDGAARD, H. **Novel approaches in prodrugs design**, Drugs Fut., Barcelona: 1992. p. 651-673.

CECHINEL FILHO, V.; CAMPOS, F.; CORREA, R.; YUNES, R.A.; NUNES, R.J. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão de literatura. **Quim. Nova**, v.26, n. 2, p. 230-241, 2003.

CHUNG, M.C. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Quím. Nova**, v. 22, n.1, p. 75-84, 1999.

CHUNG, M.C.; SILVA, A.T.A.; CASTRO, L.F.; GÜIDO, R.V.C.; NASSUTE, J.C.; FERREIRA, E.I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, v. 41, n. 2, p. 155-179, 2005.

COLLIN, X.; ROBERT, J.M.; WIELGOSZ, G.; LE BAUT, G.; DUBIGEON, C.B.; GRIMAUD, N.; PETIT, J.Y. New anti-inflammatory N-pyridinyl(alkyl)phthalimides acting as tumour necrosis factor- α production inhibitor. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 36, p. 639-649, 2001.

COLLINS C.H.; BRAGA, G.L; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6. ed. São Paulo: Editora Unicamp, 1995, p. 45-56.

DUARTE, I.; BEDRIKOW, R.B.; KOBATA, C. Fototerapia na psoríase. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. **Consenso brasileiro de**

psoríase. Rio de Janeiro, 2009. cap. 7, p. 55-61. Disponível em: <http://cbp.med.br>. Acesso em: 28 jul. 2010.

JEFFES, E.W.B.; McCULLOUGH, J.L.; PITTELKOW, M.R. et al. Methotrexate therapy of psoriasis. Differential sensitivity of proliferating lymphoid and epithelial cells to the cytotoxic and growth-inhibitory effects of methotrexate. **J. Invest. Dermatol.**, v.104, p.183-188, 1995.

KOROLKOVAS, A. **Essentials Medicinal Chemistry**. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience, 1988.

KRUEGER, G.; KOO, J.; LEBWOHL, M.; MENTER, A.; STERN, R.S.; ROLSTAD, S. The impact of psoriasis on quality of life. **Arch. Dermatol.**, v. 137, p. 280-284, 2001.

LIMA, L. M.; CASTRO, P.; MACHADO, A. L.; FRAGA, C. A.M.; LUGNIER, C.; MORAES, V.L.G.; BARREIRO, E.J. Synthesis and anti inflammatory activity of phtalimide derivates, designed as new thalidomids analogues. **Bioorg. Méd. Chem.**, v.10, p. 3067-3073, 2002.

LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Química Nova.**, v.24, p. 683-688, 2001.

LIMA, R.B. Doenças de pele: psoríase. Figura (1,2,4,5). 2011. Disponível em: <http://www.dermatologia.net/novo/base/doencas/psoriase.shtml>. Acesso em: 16 ago. 2011.

MANO, E. B.; SEABRA, A. **Práticas de química orgânica**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2002, p. 206.

MARTINS, G.A.; ARRUDA, L. Tratamento sistêmico da psoríase: Parte 1: metotrexato e acitretina. **An. Bras. Dermatol.**, v. 79, p. 263-278, 2004.

MENGER, F.M.; ROURK, M.J. Syntesis and reactivity of 5-fluoruracil/cytarabine mutual produgs. **J. Org. Chem.**, v. 62, p. 9083-9088, 1997.

PEREIRA, D.G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007

PSORÍASE eritrodérmica. 2010. Disponível em:

<http://bemvivedopsoriase.blogspot.com/2010/10/psoriase-eritrodermica.html>.

Acesso em: 26 jun. 2011.

RAPP, S.R.; FELDMAN, S.R.; EXUM, M.L.; FLESCHER JR., A.B.; REBOUSSIN, D.M. Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.41, n. 3, p. 401-407, 1999.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 391, p. 97-103, 2000.

ROMITI, R.; MARAGNO, L.; ARNONE, M.; TAKAHASHI, M.D.F. Psoríase na infância e adolescência: educação médica continuada. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n. 1, p. 9-22, 2009.

SANCHEZ, A.P.G. Imunopatogenese da psoríase. **An. Bras. Dermatol.**, v. 85, n. 5, p. 747-749, 2010.

SANTOS, J. L. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de compostos híbridos potencialmente ativos para o tratamento da anemia falciforme.** 2007. 220f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

SILVA, M. **Tuberculostáticos potenciais: pró-fármacos poliméricos formadores de micela derivados de isoniazida, rifampicina, pirazinamida.** 2001. (Doutorado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo, 2001.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1998. p.198.

SINGH, G., SHARMA, P. D. Mutual prodrugs: a recent trend in prodrugs design. **Indian J. Pharm. Sci.**, v. 56, n. 3, p. 69-79, 1994.

SINKULA, A.A. Sustained drug action accomplished by the prodrug approach. In: BUNDGAARD, H. (Ed.) **Design of prodrugs**. Amsterdam: Elsevier, p. 157-176, 1995.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. **Consenso brasileiro de psoríase**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <http://cbp.med.br>. Acesso em: 28 jul. 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA. **Perfis nosológicos das consultas dermatológicas no Brasil**. An. Bras. Dermatol. v. 81, p. 549-558, 2006.

SOLOMONS, T.W.G. Química orgânica. 11. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 1983. v.3, p. 450; 796-797.

TESTA, B. Prodrug research: futile or fertile? **Bioch. Pharm.**, v. 68, 2004. p. 2097-2106.

WERMUTH, M.C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: JOLLES, G.; WOOLDRIDGE, K.R.H. (Ed.) **Drug design: fact or fantasy?** New York: Academic, 1984. p. 47-72.

9. ANEXO

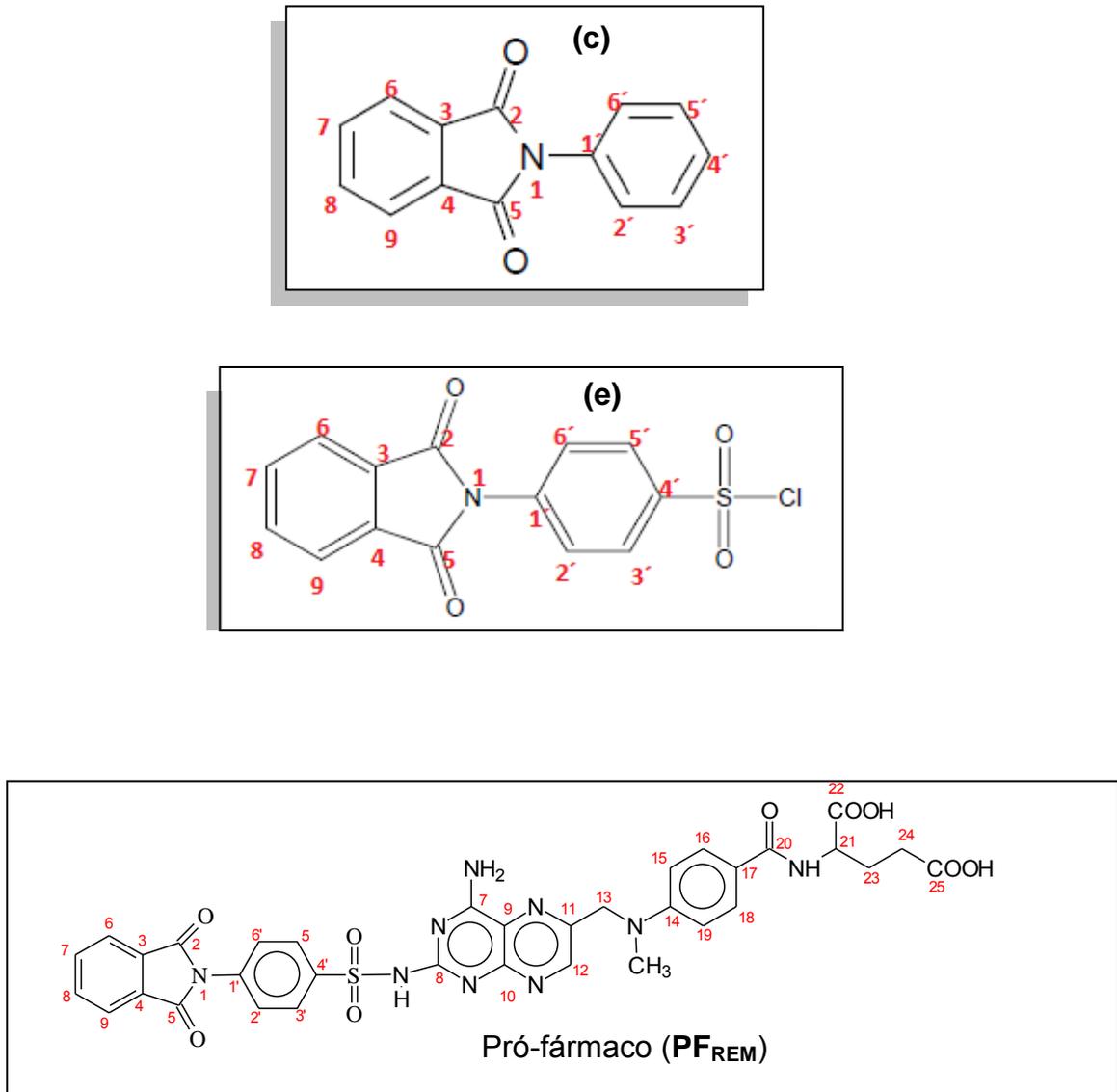


Figura 14 – Estruturas químicas dos compostos sintetizados.