

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

Síntese de Pró-Fármaco Recíproco Derivado do ácido micofenólico

Lucas dos Reis Ercolin

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara-SP

2013

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus Araraquara

Síntese de Pró-Fármaco Recíproco Derivado do ácido micofenólico

Lucas dos Reis Ercolin

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica,
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de
Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Araraquara-SP

2013

“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você.”

Carl Sagan

Dedico este trabalho,

Aos meus pais Roberto e Rita,

e ao meu irmão Caio,

por todo o suporte e presença durante minha vida.

Agradecimentos

As duas maiores mentes brilhantes a caminharem por este pálido ponto azul, Roberto e Rita, meus pais. Professores que me proporcionaram uma educação focada e ética durante toda a vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, pela atenção, paciência e orientação não apenas neste projeto, mas durante toda a minha graduação.

Aos amigos de laboratório Rafael Chelucci, Arthur Svendsen, Renata Mota, Luiza Mota, Paulo Renato Yamasaki, Thaís Melo, Priscila Longhin, Marcella Gabrielle, Luíz Dutra, Juliana Reis, e Diego Chiba.

Aos professores Prof. Dr. João Aristeu da Rosa e Profa. Dra. Patrícia de Carvalho Mastroiani, pela atenção e exemplo de atuação nos assuntos relacionados a farmácia e sociedade.

Às repúblicas que moldaram minha formação e que expandiram minha visão de mundo: República Várzea e Real República BoaBayEla. Meu caminho desde meu primeiro dia de graduação, até a conclusão deste trabalho foram moldados pelas experiências únicas que vivi nestas casas.

E a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho e com a minha formação profissional, política, ética e crítica. E obrigado a Thor, deus do Trovão, filho de Odin, neto de Borr.

Sumário

1 - Introdução	12
2 - Condições e/ou doenças envolvendo aumento exacerbado da resposta inflamatória celular	12
3 - Transplante de Órgãos.....	12
4 - Reações de Hipersensibilidade	15
5 - Tratamento das condições e/ou doenças envolvendo aumento exacerbado da resposta inflamatória celular.....	18
6 - Transplante de Órgãos.....	18
7 - Tratamento em reações de Hipersensibilidade	24
8 - Desenvolvimento de Fármacos	28
9 - Objetivos	32
10 - Planejamento estrutural	32
11 - Materiais e métodos	34
12 - Materiais.....	34
13 - Equipamentos	35
14 - Resultados e Discussão.....	36
15 - Síntese	36
16 - Caracterização Estrutural do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona obtida por catálise básica em piridina	40

17 - Caracterização do acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila obtido por catálise ácida em ácido acético glacial.....	43
18 - Síntese por catálise em tolueno	48
19 - Caracterização do Produto Final obtido por agente acoplante.....	49
20 - Conclusão	54
21 - Bibliografia	55
22 - Anexos	69

Lista de Figuras

Figura 1: Alorreconhecimento Direto e Indireto (Retirado de ROGERS & LECHLER, 2011).....	13
Figura 2: Mecanismo de ação dos glicocorticóides na inflamação e imunossupressão (RHEN e CIDLOWSKI, 2005).....	20
Figura 3: ácido micofenólico e seu sal micofenolato de sódio.....	22
Figura 4: Estrutura química planar da talidomida	27
Figura 5: Mecanismo in vivo de liberação da parte ativa (fluoruracila) do pró-fármaco misto capecitabina (Editado de JANA; MANDLEKAR; MARATHE, 2010)	30
Figura 6: Representação estrutural de um pró-fármaco recíproco baseado em ácido micofenólico e um análogo estrutural de talidomida	32
Figura 7: Proposta de análogo estrutural de talidomida com função álcool	33
Figura 8: Metodologias sintéticas para obtenção de pró-fármacos de ácido micofenólico	36
Figura 9: Reação de hidrólise do grupo lactona do ácido micofenólico em meio ácido.....	38
Figura 10: Síntese proposta para obtenção do “2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona”, baseado em SANTOS, et al., 2011..	39
Figura 11: Síntese proposta para a obtenção do Produto Final, baseado em LEE, et al. 1990 e MALACHOWSKA-UGARTE, et al. 2012.....	40

Figura 12: Proposta de mecanismo para esterificação do grupo álcool e formação do produto acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila 47

Figura 13: Comparativo estrutural entre a talidomida e os análogos do estudo.
..... 49

Lista de Tabelas

Tabela 1: Ensaios clínicos e casos clínicos em que se utiliza os principais fármacos imunossupressores para as principais doenças auto imunes.....	25
Tabela 2: Absorção no infravermelho dos grupos funcionais do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona.....	41
Tabela 3: Deslocamento químico no espectro de RMN- ¹ H do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona.....	42
Tabela 4: Absorção no infravermelho dos grupos funcionais do acetato de 3-(1,3-dioxoisoindolina-2-il)benzila.....	44
Tabela 5: Deslocamento químico no espectro de RMN- ¹ H do acetato de 3-(1,3-dioxoisoindolina-2-il)benzila.	46
Tabela 6: Absorção no infravermelho dos grupos funcionais do Produto Final	50
Tabela 7: Comparativo do deslocamento químico no espectro de RMN- ¹ H entre o Produto Final, 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona e ácido micofenólico	52

Lista de Espectros

Espectro 1: Espectro no infravermelho do análogo estrutural de talidomida 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona (pastilha de KBr)	40
Espectro 2: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona (RMN- ¹ H; 300 MHz, acetona-d ₆).	42
Espectro 3: Espectro no infravermelho do acetato de 3-(1,3-dioxoisoindolina-2-il)benzila por catálise ácido em ácido acético glacial (pastilha de KBr)	44
Espectro 4: Comparação por sobreposição entre os espectros do acetato de 3-(1,3-dioxoisoindolina-2-il)benzila (em azul) e o 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona (em verde)	45
Espectro 5: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do produto acetato de 3-(1,3-dioxoisoindolina-2-il)benzila (RMN- ¹ H; 300 MHz, acetona-d ₆).	46
Espectro 6: Espectro no infravermelho do produto final por agente acoplante (pastilha de KBr)	50
Espectro 7: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do Produto Final (RMN- ¹ H; 300 MHz, acetona-d ₆)	51

Resumo

O transplante de órgãos é um processo em que se transferem tecidos e/ou órgãos sólidos de um doador vivo ou cadavérico para um hospedeiro. A resposta imune aos aloantígenos, antígenos de um membro da mesma espécie, do doador, caracteriza o processo de rejeição de órgãos.

As reações de hipersensibilidade são causadas por respostas imunes controladas inadequadamente, como na formação de complexos antígeno-anticorpo circulantes no Lúpus Eritematoso Sistêmico, ou direcionadas ao tecido do paciente, por resposta de anticorpos, como na Febre Reumática Aguda, e por resposta linfocitária, como na Esclerose Múltipla.

A terapia farmacológica para transplantes de órgãos e para reações de hipersensibilidade se baseia na utilização de fármacos imunossupressores, como a prednisona, ciclosporina, anticorpos monoclonais, ácido micofenólico e azatioprina. A talidomida, fármaco com propriedades inibidoras da produção de Fator de Necrose Tumoral Alfa em monócitos, atua como imunossupressor e anti-inflamatório, com atividade de interesse para o tratamento destas condições.

Nesse contexto, foi sintetizada, purificada e caracterizada a estrutura química de um novo pró-fármaco planejado para atuar com mecanismo duplo de ação a saber: inibição da inosina 5'-monofosfato desidrogenase e da produção do fator de necrose tumoral alfa.

Introdução

1. Condições e/ou doenças envolvendo aumento exacerbado da resposta inflamatória celular

Transplante de Órgãos

Transplante é um processo em que se retira células, tecidos e/ou órgãos, chamados de enxerto, de um indivíduo, denominado doador, e transfere-se para um segundo indivíduo, denominado receptor ou hospedeiro (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

O sucesso do transplante de órgãos está diretamente envolvido com a compatibilidade celular e/ou tecidual entre o doador e o receptor, sendo a resposta imunológica a principal limitadora para o sucesso. (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

O órgão ou tecido a ser doado pode ter origem de um doador vivo, o que permite melhor análise da histocompatibilidade entre doador-receptor e menor nível de estresse fisiológico do enxerto. Órgãos cadavéricos são obtidos sob condições de extremo estresse fisiológico, podendo importante resposta inflamatória pelo sistema imune inato no receptor (BALDWIN III, P. e FAIRCHILD, 2001).

O reconhecimento de antígenos entre membros da mesma espécie é chamada de “Alorreconhecimento” (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008) e tem como principal alvo de resposta imunológica o “Complexo Principal de Histocompatibilidade” - MHC (ROGERS e LECHLER, 2001). O

alorreconhecimento pode ser “Direto” ou “Indireto”, sendo o “Indireto” indistinguível da resposta imune adquirida contra qualquer outro antígeno. O alorreconhecimento direto é gerado pela resposta imune do hospedeiro à célula apresentadora de antígenos do doador presente no enxerto (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

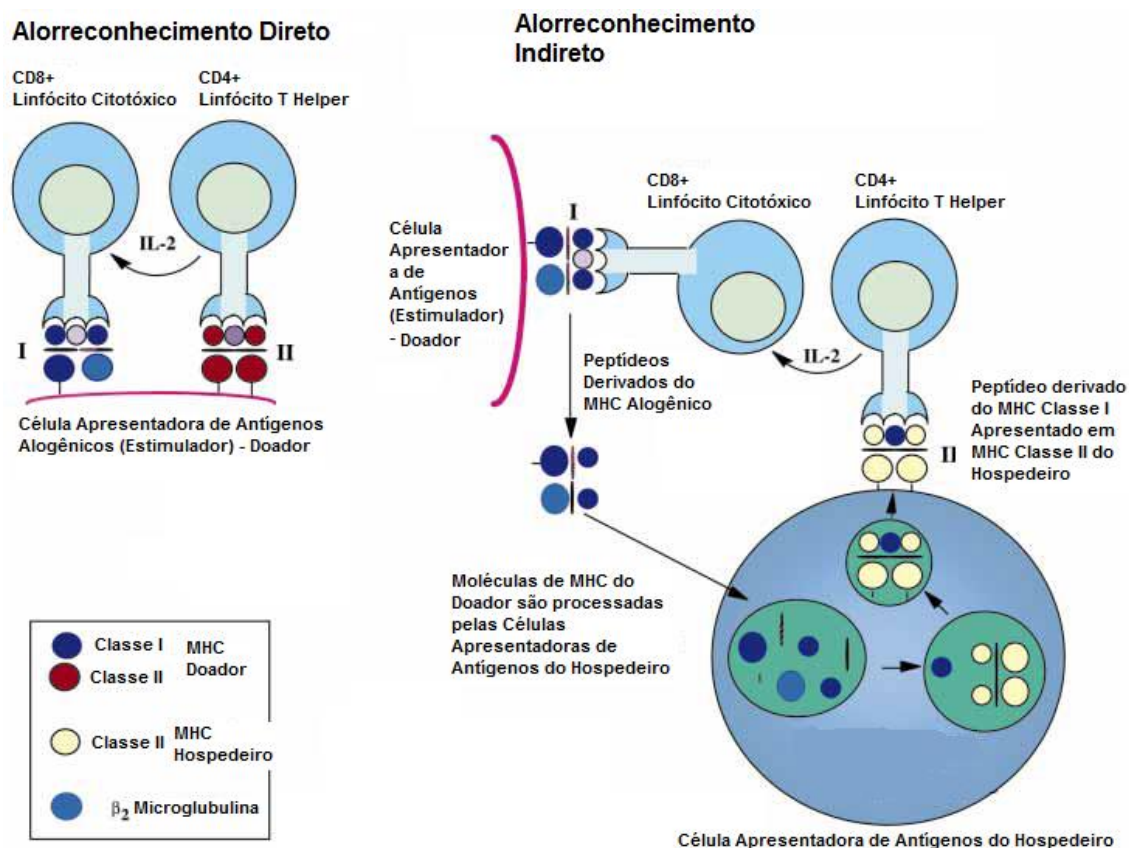


Figura 1: Alorreconhecimento Direto e Indireto (Retirado de ROGERS & LECHLER, 2011)

A rejeição pode ser hiperaguda (acontece em minutos ou horas após a anastomose entre os vasos sanguíneos do hospedeiro e do enxerto), aguda (após a primeira semana de transplante) ou crônica (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

A rejeição hiperaguda está associada com a resposta de anticorpos previamente produzidos contra os aloantígenos do enxerto e a ativação do complemento (COLVIN e SMITH, 2005), devido a pré-sensibilização aos aloantígenos do doador.

A rejeição aguda (“Acute Antibody-Mediated Rejection”) é diagnosticada usando de critérios específicos para cada órgão sólido transplantado, entre eles evidências sorológicas de anticorpos anti-doador, evidência clínica de disfunção do enxerto e presença de C4d em artérias e capilares (TAKEMOTO, *et al.*, 2004).

A deposição de C4d atua como marcador específico (96%) e sensível (95%) para rejeição aguda, comparado com a presença de aloanticorpos anti-doador, usado como padrão ouro (FEUCHT, *et al.*, 1991) e está relacionado com a presença do complemento na resposta aguda (COLVIN e SMITH, 2005).

A rejeição crônica é um processo que se desenvolve lentamente por meses ou anos. O processo é caracterizado pela oclusão de artérias e pela perda contínua da função do enxerto (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008). Os fatores envolvidos na Rejeição Crônica são: Histórico de Rejeição Aguda, Função do Órgão antes do Transplante, Morte Cerebral/Órgão Cadavérico, Lesão de Isquemia-Reperfusão e Senescência Celular (WAAGA, *et al.*, 2000). O espessamento das artérias, devido ao acúmulo de células musculares lisas, é estimulado por fatores secretados pelas células endoteliais, musculares lisas e macrófagos, devido a atividade do interferon-gama e ao fator de necrose tumoral alfa (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

Assim, a terapêutica para a Rejeição Aguda e para a diminuição dos fatores de risco para a Rejeição Crônica, envolvem a terapêutica imunossupressiva, que inibem ou eliminam principalmente os linfócitos T (CD4+ e CD8+).

Reações de Hipersensibilidade

As patologias por hipersensibilidade estão relacionadas com respostas imunológicas controladas inadequadamente ou direcionadas ao tecido do paciente, tornando a reação imunológica, usualmente benéfica, em uma doença (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

Classifica-se as doenças imunológicas de acordo com o mecanismo imunopatológico

- Hipersensibilidade Tipo 1 (Imediata):

Alguns antígenos ambientais podem levar à diferenciação de linfócitos CD4+T_H2 e a produção de IgE. Quando os antígenos fazem ligação cruzada com IgE associado a células, há rápida liberação de mediadores imunológicos (STANWORTH, 1970), causando aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, broncoconstrição, etc. Na clínica, as Reações de Hipersensibilidade Imediata, ou do Tipo I, são chamadas comumente de Alergia (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

- Hipersensibilidade Tipo 2:

As Reações de Hipersensibilidade do Tipo 2, diferente das de Tipo I, são mediadas por anticorpos IgM e IgG direcionados a autoantígenos ou a exoantígenos que, por reação cruzada, interagem com antígenos do paciente

(ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008). Existem dois principais mecanismos imunológicos: A via clássica do sistema complemento é ativada devido a opsonização da célula alvo, iniciando um processo de fagocitose devido a receptores Fc ou receptores C3. A ativação e recrutamento de neutrófilos e macrófagos, devido a ativação do complemento, iniciam um processo inflamatório e lesão tecidual (CHEN, DAHA e KALLENBERG, 2010).

O segundo mecanismo está relacionado a autoanticorpos contra receptores celulares, levando a estimulação constante (como na Doença de Graves, em que há um hipertireoidismo devido a ação do anticorpo anti-receptor de TSH (WEETMAN, 2000) ou a inibição do receptor (Como na Diabetes Insulino-Resistente) (TAN e MCMANUS, 1987).

Diversas patologias estão envolvidas com Reações de Hipersensibilidade do Tipo II: Anemia hemolítica Autoimune, Púrpura Trombocitopênica Autoimune, Pênfigo Vulgar, Vasculite Causada por Anticorpos Citoplasmáticos Antineutrófilos Síndrome de Goodpasture, Febre Reumática Aguda, Miastenia Grave, Doença de Graves (Hipertireoidismo), Anemia Perniciosa, etc. (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

- Hipersensibilidade Tipo 3

A Reação de Hipersensibilidade do Tipo 3 acontece devido a formação de complexos imunes na circulação que não são adequadamente eliminados pelas células imunes (SHMAGEL e CHERESHNEV, 2009). Uma vez que os complexos tendem a estar presentes na circulação, não há especificidade da doença a um determinado tecido, como o que acontece na Tipo 2 (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

Os antígenos relacionados a esse tipo de hipersensibilidade não são necessariamente próprios, como no caso da Doença do Soro, em que diversas exoproteínas estão envolvidas com a formação de complexos (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008). Já no Lúpus Eritematoso Sistêmico, os principais antígenos envolvidos são o DNA e nucleoproteínas (RAHMAN e ISENBERG, 2008).

A deposição de complexos antígeno-anticorpo acontecem principalmente em pequenas artérias, glomerulos renais e no líquido sinovial. Estes complexos são capazes de ativar o sistema complemento e receptores Fc, iniciando um processo inflamatório no local de deposição (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

Entre as patologias baseadas na Reação de Hipersensibilidade do Tipo 3, temos: Lúpus Eritematoso Sistêmico, Poliarterite Nodosa, Glomerulonefrite Pós-Estreptocócica, Doença do Soro, etc.

- Hipersensibilidade do Tipo 4 (Tipo Tardio)

Diferente das demais reações, a Hipersensibilidade do Tipo Tardio não é mediada por anticorpos, mas por linfócitos T que geram processos inflamatórios, lesão tecidual e destruição celular (KALISH e ASKENASE, 1999).

O mecanismo envolvido no Tipo 4 é semelhante ao da rejeição de órgãos, em que a Célula Apresentadora de Antígenos, ou o antígeno tecidual, ativa linfócitos T CD4+, liberando citocinas pró-inflamatórias e, em algumas doenças, ativa linfócitos T CD8+ contra as células que expressam o antígeno (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

Entre as patologias imunológicas mediadas por linfócitos T, temos: Diabetes Mellito Tipo I, Artrite Reumatóide, Esclerose Múltipla, Doença de Crohn, Neurite Periférica, Miocardite autoimune, etc.

Todas as Reações de Hipersensibilidade, exceto a do Tipo I, ocorrem em patologias autoimunes. Assim, seu tratamento é baseado na terapia imunossupressora (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

2. Tratamento das condições e/ou doenças envolvendo aumento exacerbado da resposta inflamatória celular

Transplante de Órgãos

Desde o desenvolvimento e utilização de medicamentos imunossupressores, como a ciclosporina e o muromonabe CD3, na década de 80, para o tratamento de rejeição aguda, houve um aumento na taxa de sobrevivência do enxerto (HARIHARAN, *et al.*, 2000).

Uma análise da taxa de sobrevivência do enxerto após transplante renal nos Estados Unidos, demonstrou-se que houve uma diminuição dos riscos de até 10,2 % por ano de 1988 a 1996. (HARIHARAN, *et al.*, 2000). Em comparação com pacientes em regime de diálise, há uma maior taxa de morte nos primeiros dias após o transplante (devido a riscos relacionados à cirurgia e à alta dose de imunossupressores na terapêutica). Contudo, há uma diminuição constante do risco de morte após o transplante, tornando-se mais vantajoso que a diálise (WOLFE, *et al.*, 1999).

Praticamente metade (43%) das perdas de enxertos são devidas à morte do paciente com enxerto funcional, se tornando mais pronunciado conforme maior tempo após o transplante, sendo que as principais causas são: problemas cardiovasculares e infecção (OJO, *et al.*, 2000).

Os fármacos imunossupressores usados na terapêutica de transplante podem ser classificadas de acordo com sua atividade (HALLORAN, 2004):

- Glicocorticóides
- Inibidores de Calcineurina
- Inibidor de mTOR
- Antimetabólitos
- Anticorpos Monoclonais
- Inibidores da Síntese de Nucleotídeos

Os glicocorticóides tem ação antiinflamatória e imunossupressora e permanecem na primeira linha de ambas as terapêuticas (COUTINHO e CHAPMAN, 2011). O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal tem uma função central na regulação do receptor glicocorticóide, que é expresso em praticamente todas as células do corpo (RHEN e CIDLOWSKI, 2005). A atividade imunossupressora se baseia na inibição de duas vias de sinalização intracelular: Inibição da via de sinalização do NF- κ B e pela inibição do c-Jun ou da c-Jun N-terminal Kinase (JNK), após a desfosforilação da MAPK Fosfatase I. Ambas as vias de sinalização são inibidas pelos glicocorticóides, inibindo a expressão de citocinas, receptores de citocinas, entre outras proteínas relacionadas com a resposta imunológica e inflamatória.

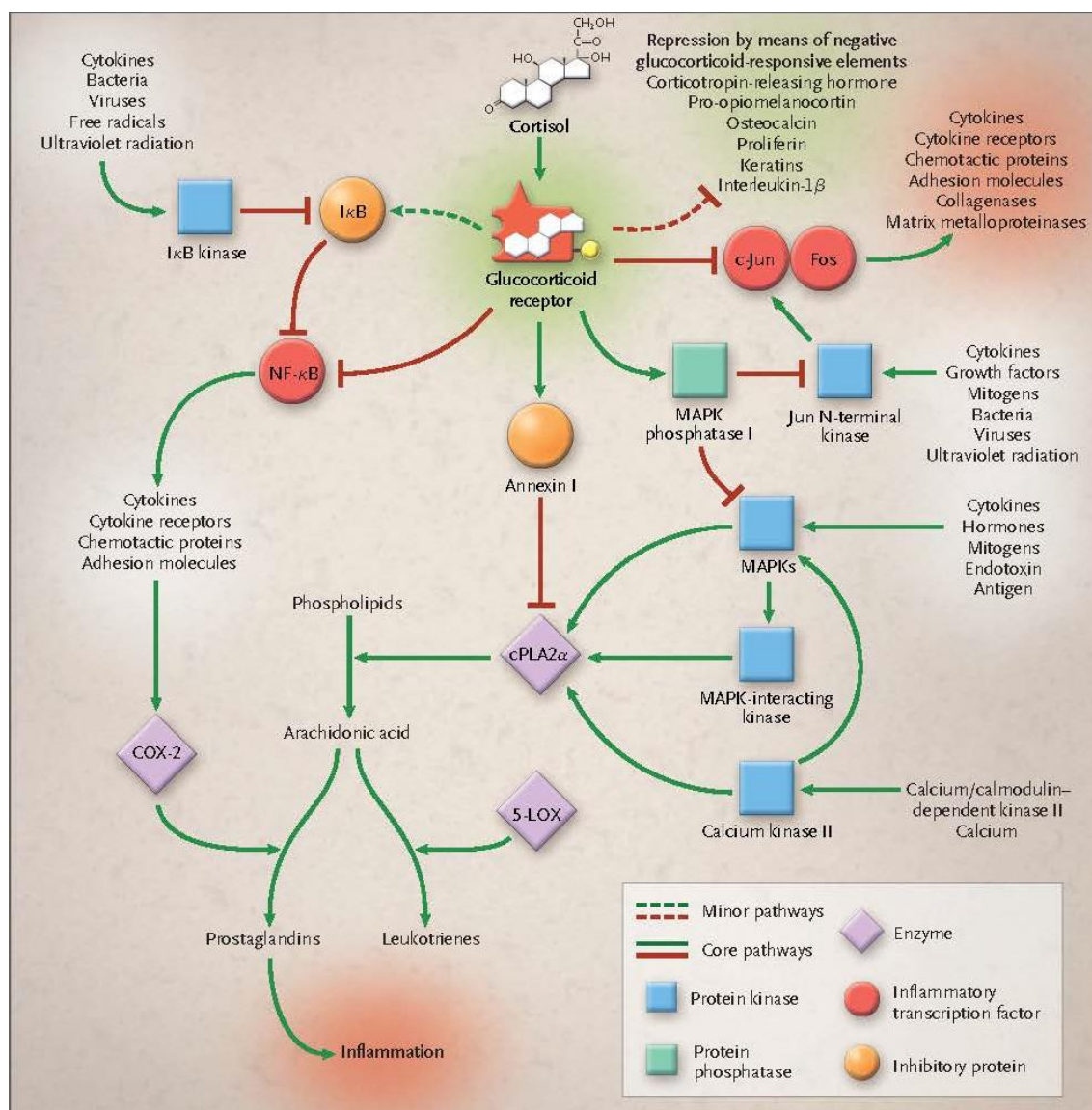


Figura 2: Mecanismo de ação dos glicocorticóides na inflamação e imunossupressão (RHEN e CIDLOWSKI, 2005)

A ciclosporina e o tacrolimo são fármacos classificados como imunofilinas. Embora atuem especificamente em proteínas diferentes, ambas inibem a calcineurina, proteína que desfosforila o “Fator Nuclear das Células T Ativadas” (NFAT), que é um fator de transcrição necessário para a expressão dos genes da IL-2, IL-4 e TNF-alfa (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

O tacrolimo e o sirolimo atuam sobre a mesma proteína, a FKBP. Porém, o complexo tacrolimo-FKBP atua inibindo a calcineurina, enquanto o complexo sirolimo-FKBP se liga ao “alvo da rapamicina em mamíferos” (mTOR), proteína necessária para a proliferação celular, bloqueando assim o ciclo celular (HALLORAN, 2004).

O principal antimetabólito usado, porém em desuso após a introdução da ciclosporina, é a azatioprina. Pró-farmaco da mercaptopurina, foi o primeiro agente imunossupressor usado em transplantes. Sua atividade é baseada na atividade da mercaptopurina em interferir na síntese de DNA (HALLORAN, 2004), bloqueando assim a proliferação de precursores de linfócitos (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008).

Os anticorpos monoclonais, usados na terapêutica hoje, atuam sobre CD3 (muromonabe CD3) e CD25 (daclizumabe e basiliximabe). O muromonabe CD3 interage com os receptores CD3, que são compostos de três proteínas: CD3 γ , δ e ϵ , e estão presentes em praticamente todas as células T (ABBAS, LICHTMAN e MBBS, 2008). A utilização de anticorpos para essa proteína pode gerar três respostas diferentes na célula, como apoptose, anergia e modulação antígenica, impedindo a resposta imune do hospedeiro (CHATENOUD e BLUESTONE, 2007).

Anticorpos monoclonais para CD25 são utilizados para pacientes com risco de rejeição baixo para moderado, uma vez que a expressão do CD25 (cadeia α do receptor de interleucina-2) requer a ativação do linfócito T. Logo, estes anticorpos são moderadamente eficientes (HALLORAN, 2004).

O principal fármaco inibidor da síntese de nucleotídeos é o ácido micofenólico, comercializado em sua forma ácida (ácido micofenólico) e na forma de sal (micofenolato de sódio).

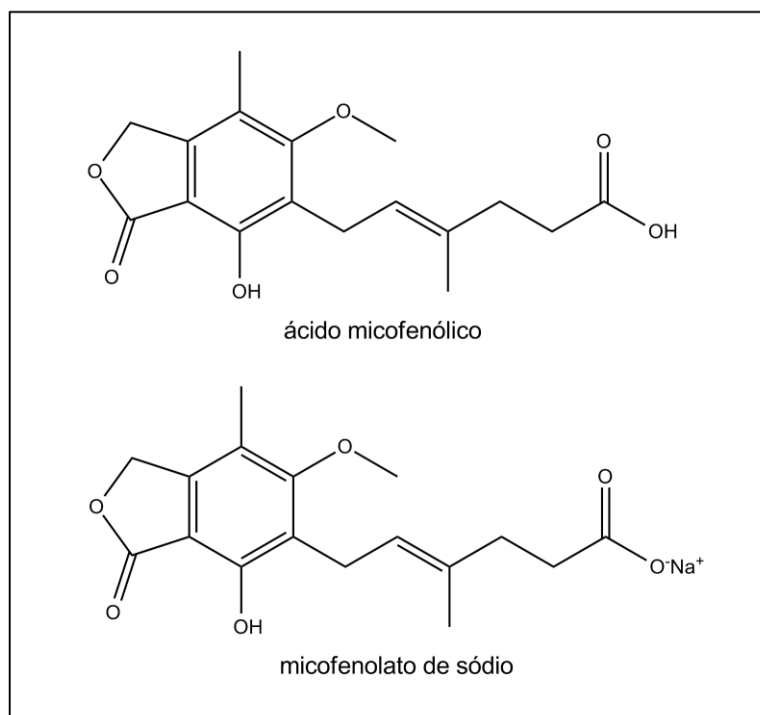


Figura 3: ácido micofenólico e seu sal micofenolato de sódio

Foi usado como antibiótico (FLOREY, *et al.*, 1946), antineoplásico (*apud* BENTLEY, 2000) e, atualmente, é utilizado na terapia como imunossupressor.

O ácido micofenólico foi obtido pela primeira vez por Bartolomeo Gosio em 1893 (*apud* FLOREY, H. W., *et al.*, 1946), sendo o primeiro antibiótico purificado de qualquer fonte (BENTLEY, 2000). Contudo sua estrutura molecular só foi obtida completamente mais de 50 anos depois, com BIRKINSHAW, RAISTRICK e ROSS, 1952.

A atividade do ácido micofenólico é baseada na inibição da enzima “Inosina 5'-monofosfato desidrogenase”, que tem função chave na

síntese de purinas (HALLORAN, 2004). Sua atividade baseia-se na oxidação da Inosina em xantosina, que é intermediária na biosíntese de purinas. (BENTLEY, 2000). Ao inibir a produção de xantosina, e por conseguinte a produção de desoxiguanosina, uma das bases nitrogenadas do DNA, inibi-se a proliferação das células, especialmente em linfócitos, por usarem preferencialmente a via “*de novo*” de síntese de purinas (ALLISON e EUGUI, 2000).

O micofenolato de mofetila é pró-farmaco derivado do ácido micofenólico com o transportador 2-morfolinoetanol, e apresenta superior biodisponibilidade, solubilidade e estabilidade química comparado ao ácido micofenólico (LEE, *et al.*, 1990). Essas características conferem vantagens ao uso do micofenolato de mofetila na terapêutica (BENTLEY, 2000).

Em um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, foi comparada a utilização de duas diferentes dosagens do micofenolato de mofetila (2 e 3 gramas, diariamente) junto da terapêutica padrão determinada pelo protocolo hospitalar, baseado na utilização de ciclosporina e corticoesteroides. O estudo demonstrou uma melhor atividade imunossupressora após o transplante, além de maior segurança terapêutica, sendo o principal efeito adverso problemas gastrointestinais dependentes de dosagem (EUROPEAN MYCOPHENOLATE MOFETIL COOPERATIVE STUDY GROUP, 1995).

Ambos estudos demonstram a possibilidade de melhor perfil farmacológico baseado na latenciação do ácido micofenólico. Contudo, a porção transportadora do micofenolato de mofetila, conforme descrito na literatura, possui atividade inibidora de β -glicosidase (ASHRY, *et al.*, 1999),

atividade não relacionada com a terapêutica imunossupressora e, pelo mesmo motivo, potencialmente prejudicial ao paciente. Assim, é possível obter-se melhor atividade imunossupressora com o desenvolvimento de um pró-fármaco recíproco em que o transportador, diferente do 2-morfolinoetanol, possua atividade de interesse.

Tratamento em reações de Hipersensibilidade

Embora as Reações de Hipersensibilidade dos Tipos 2, 3 e 4 incluam diversas patologias e antígenos diferentes o tratamento é baseado na imunossupressão

Tabela 1: Ensaios clínicos e casos clínicos em que se utiliza os principais fármacos imunossupressores para as principais doenças auto imunes.

Relação Entre o Uso de Fármacos Imunossupressores e Patologias Causadas por Hipersensibilidade

		predinisona	ciclosporina	Antimetabólitos	Anticorpos monoclonais	micofenolato de mofetila
Hipersensibilidade Tipo 2						
	Anemia Hemolítica Autoimune	LECHNER e JÄGER, 2010				
	Púrpura Trombocitopênica Autoimune	RODEGHIERO <i>et al.</i> , 2009				PROVAN <i>et al.</i> , 2006
	Pênfigo Vulgar	LEVER e SCHAUMBURG-LEVER, 1977		ABERER <i>et al.</i> 1987	AHMED <i>et al.</i> , 2006	ENK e KNOP, 1999
	Vasculite Causada por ANCA	SMITH, JONES e JAYNE, 2012				
	Síndrome de Goodpasture	LOCKWOOD <i>et al.</i> 1976		LOCKWOOD <i>et al.</i> 1976	ARZOO, SADEGHI e LIEBMAN, 2002	GARCÍA-CANTON <i>et al.</i> , 2000
	Miastenia Grave	DRACHMAN, 1994			LEBRUN <i>et al.</i> 2009	
	Doença de Graves	Terapia baseada em inibidores da síntese do hormônio tireoidiano (WARTOFSKY <i>et al.</i> 1991)				
	Anemia Perniciosa	Terapia baseada em suplemento de vitamina B12 (EPSTEIN, 1997)				

Outra abordagem terapêutica é baseada na inibição do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α). A sua inibição influencia diretamente as vias de sinalização do NF- κ B, diminuindo a ativação da via de sinalização pelo CD120, ou Receptor do Fator de Necrose Tumoral, TNFR1. (PALLADINO, *et al.*, 2003). Ao diminuir a via de sinalização NF- κ B, podemos esperar resposta dose-dependente (SAMPAIO, *et al.*, 1991) semelhante aos glicocorticoides.

A talidomida foi um fármaco sintetizado em 1956 pela Chemie Grunenthal e usado como sedativo aparentemente seguro, como alternativa aos barbitúricos, e como antiemético (CHAULET, *et al.*, 2011). Contudo sua utilização, especialmente por gestantes, foi responsável pelo famigerado “Desastre da Talidomida” (BURGIO, 1981).

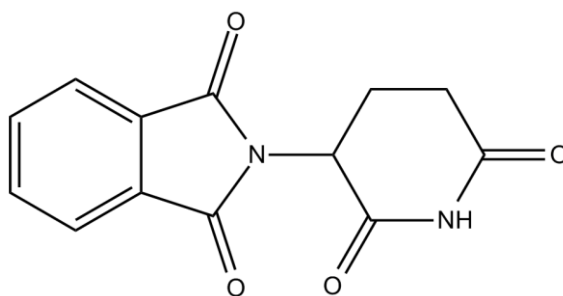


Figura 4: Estrutura química planar da talidomida

Entretanto, 40 anos depois, a talidomida emerge como um fármaco com atividades imunomoduladora, antiinflamatória e imunossupressora (BORGES e FRÖEHLICH, 2003).

Embora não esteja claro o completo mecanismo de ação da talidomida como imunomodulador (PALLADINO, *et al.*, 2003), evidências demonstram que o fármaco está relacionado com a inibição da produção de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) em monócitos (SAMPAIO, *et al.*, 1991).

3. Desenvolvimento de Fármacos

Estima-se que o custo envolvido no processo de desenvolvimento de novos fármacos variem entre 500 milhões até mais de 2 bilhões de dólares americanos, dependendo da patologia a ser tratada (ADAMS e BRANTNER, 2006). Além do alto custo há dificuldade, por parte das indústrias farmacêuticas, em prever o mercado de medicamentos e o custo durante o desenvolvimento (CHA, RIFAI e SARRAF, 2013), tornando a pesquisa um investimento de risco (DICKSON e GAGNON, 2004).

Neste âmbito, a utilização de estratégias baseadas na modificação molecular e no planejamento racional de fármacos, ou de modelos conhecidos, nos permite desenvolver novas moléculas inovadoras, com menores custos que outras técnicas.

A modificação molecular é baseada na síntese de análogos ou homólogos estruturais de fármacos ou modelos com atividade biológica conhecida, a fim de alterar suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, estabilidade e propriedades organolépticas, e biológicas, que estão relacionadas com os aspectos clínicos dos modelos, como segurança e eficácia clínica (FERREIRA e KOROLKOVAS, 1980).

Entre as técnicas de modificação molecular, destaca-se a latenciação, transformação do fármaco em uma forma inativa ligada a um transportador, isto é, sem atividade farmacológica, que *in vivo*, mediante a reação química ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação, ou próximo a ele (CHUNG e FERREIRA, 1999). Os fármacos obtidos pelo processo de latenciação são denominados “pró-fármacos” (VERT *et al.*, 2012).

Atualmente entre 5 e 7% dos fármacos aprovados internacionalmente são pró-fármacos. Contudo o real potencial está apenas começando a ser compreendido (RAUTIO *et al.*, 2008). Entre os pró-fármacos em uso na terapêutica, temos como exemplos a azatioprina, enalapril (JANA, MANDLEKAR e MARATHE, 2010), fanciclovir e prednisolona (RAUTIO *et al.*, 2008).

Os pró-fármacos podem ser classificados em: clássicos, bioprecursores, mistos, recíprocos e dirigidos (CHUNG *et al.*, 2005).

Os pró-fármacos clássicos seguem a definição da latenciação, sendo usualmente inativos e devem sofrer hidrólise (por via química ou enzimática) para liberar a porção ativa, isto é, o fármaco que estava ligado ao transportador (CHUNG *et al.*, 2005). Estima-se que 49% de todos os pró-fármacos disponíveis na terapêutica sejam ativados por hidrólise (RAUTIO *et al.*, 2008).

Os bioprecursores são pró-fármacos que não possuem transportadores. Todavia eles precisam ser biotransformados *in vivo* através de diferentes tipos de sistemas enzimáticos (normalmente enzimas oxidativas ou redutoras), atuando como substratos enzimáticos que geram produtos farmacologicamente ativos. (JANA, MANDLEKAR, MARATHE, 2010).

Os pró-fármacos mistos possuem as características dos clássicos e dos bioprecursores. Esta classe é composta por moléculas inicialmente inativas, dotadas de um transportador. Porém, a liberação da parte ativa depende de diversas reações químicas e/ou enzimáticas, o que aumenta a concentração do fármaco ativo no local de ação (CHUNG *et al.*, 2005).

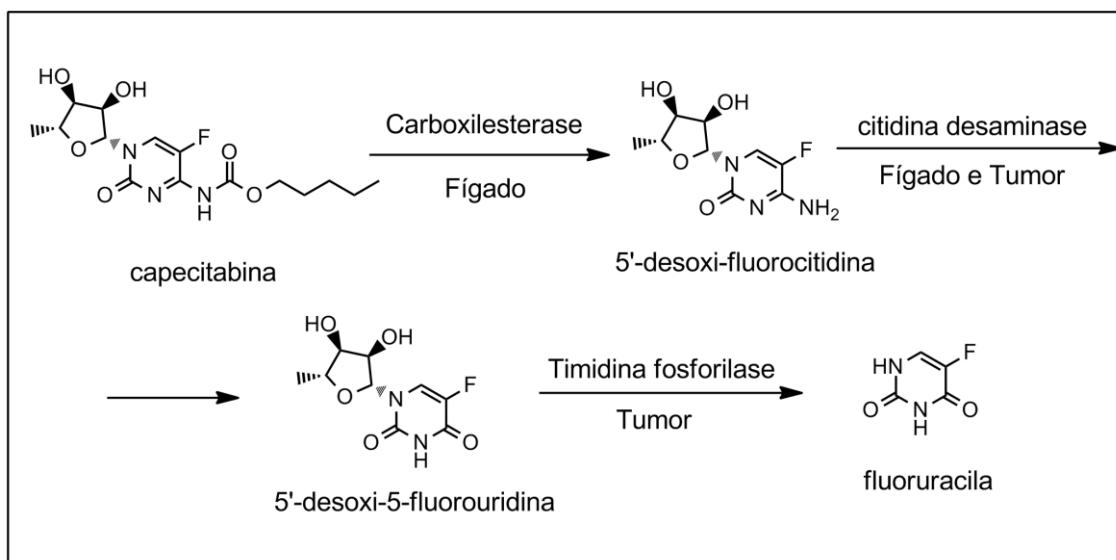


Figura 5: Mecanismo in vivo de liberação da parte ativa (fluoruracila) do pró-fármaco misto capecitabina (Editado de JANA; MANDLEKAR; MARATHE, 2010)

O pró-fármaco recíproco, diferentemente do clássico, possui como transportador uma molécula ativa, normalmente com mecanismo de ação sinérgico ao outro fármaco. No caso da olsalazina, temos um pró-fármaco recíproco em que as duas porções são do mesmo fármaco (CHUNG *et al*, 2005).

Os pró-fármacos dirigidos possuem transportadores seletivos para o local de ação, visando diminuir as reações adversas provocadas pela inespecificidade do fármaco, diminuindo a toxicidade e a dose necessária. (CHUNG *et al.*, 2005) O conhecimento da presença de receptores específicos no local de ação permite a escolha do transportador adequado. Uma abordagem no desenvolvimento de pró-fármacos dirigidos baseia-se nos “Direct Enzyme Prodrug Therapy”, divididos em “Antibody Direct Enzyme Prodrug Therapy”, em que um conjugado enzima-anticorpo interage com um

antígeno específico do local de ação, permitindo a hidrólise do pró-fármaco no local; “Gene Direct Enzyme Prodrug Therapy”, em que é inserido um gene em que expressa a enzima de interesse em um vetor não viral e o “Viral Direct Enzyme Prodrug Therapy”, em que o vetor do gene de interesse é viral (JANA, MANDLEKAR, MARATHE, 2010).

Conforme Ferreira & Korolkovas (1980), os principais critérios a serem avaliados durante o planejamento de pró-fármacos incluem:

1. Presença de grupos funcionais que possam ser derivados em grupos hidrolizáveis;
2. Métodos sintéticos para modificações específicas (no caso de grupos funcionais de reatividade semelhante);
3. Custo dos intermediários químicos não deve ser proibitivo;
4. A síntese e purificação devem ser simples, para obter-se maior rendimento;
5. Deve ser estável diante aos elementos que compõem a formulação
6. Baixa ou tolerável toxicidade do transportador
7. O fármaco deve ser regenerado *in vivo*.

Como supracitado, o micofenolato de mofetila é um exemplo de pró-fármaco clássico do ácido micofenólico que teve melhor resultado clínico em relação a sua forma ativa sem o transportador. Assim, o planejamento de novos derivados do ácido micofenólico, baseados na técnica de latenciação, podem permitir a obtenção de novas estruturas de interesse.

Objetivos

O objetivo deste trabalho é sintetizar, purificar e caracterizar a estrutura química de novos pró-fármacos planejados para atuar com mecanismo duplo de ação a saber: inibição da inosina 5'-monofosfato desidrogenase e da produção do fator de necrose tumoral alfa.

Planejamento estrutural

Para obtenção de fármacos superiores ao micofenolato de mofetila, um recurso possível de ser utilizado é a latenciação do ácido micofenólico com um transportador com atividade farmacológica complementar à terapêutica imunossupressora, obtendo-se então um Pró-Fármaco Recíproco (CHUNG e FERREIRA, 1999).

O planejamento molecular de pró-fármacos recíprocos proposto neste estudo baseia-se na formação de uma ligação éster entre o ácido micofenólico e um análogo estrutural de talidomida, de modo semelhante ao realizado no micofenolato de mofetila.

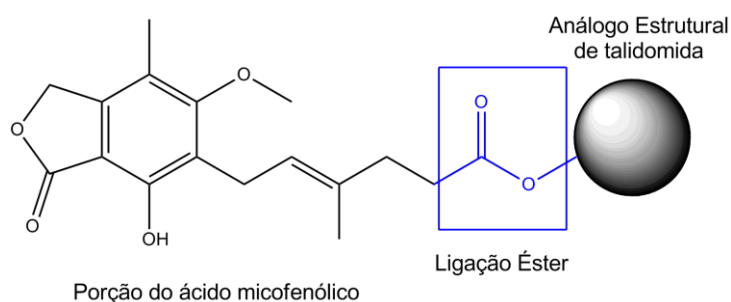


Figura 6: Representação estrutural de um pró-fármaco recíproco baseado em ácido micofenólico e um análogo estrutural de talidomida

Diversos análogos estruturais de talidomida foram desenvolvidos visando uma superior atividade. Na literatura acadêmica encontram-se diversos análogos não baseados na modificação molecular da porção ftalimídica da talidomida, mas sim na porção glutarimida, como proposto por LIMA, *et al.*, 2002 e MACHADO, *et al.*, 2005. Em ambos os estudos o grupo foi substituído por um grupo fenil dissustituído, mantendo a atividade inibidora da produção de TNF- α em neutrófilos.

Assim, planejou-se um análogo estrutural da talidomida com a função álcool, permitindo a posterior formação do éster com o ácido micofenólico.

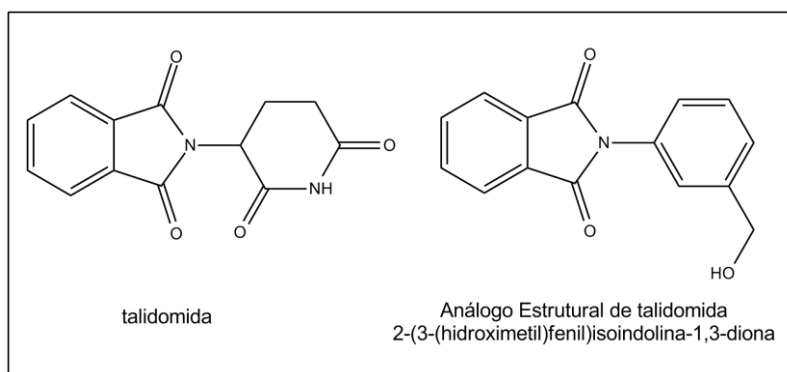


Figura 7: Proposta de análogo estrutural de talidomida com função álcool

A síntese do análogo proposto (“2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona”) está presente na literatura porém sem descrição da sua atividade em relação ao TNF- α ou a qualquer outra atividade (SANTOS, *et al.*, 2011).

Materiais e métodos

Materiais

- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
- 3-(aminofenil)metanol
- 4-dimetilaminopiridina
- acetato de etila
- 1:1 acetato de etila/hexano
- ácido acético glacial
- ácido micofenólico
- ácido tolueno-4-sulfônico
- água destilada
- anidrido ftálico
- diclorometano
- 1:1 diclorometano/éter etílico
- éter etílico
- hexano
- *N*-(2-hidroxietil)ftalimida
- ninidrina
- piridina

- sílica para coluna 0,06-0,2 mm
- sulfato de cobre
- sulfato de sódio
- tolueno
- trietilamina

Equipamentos

- Espectrômetro de 300 MHz WB Fourier com Dual probe $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ – Brüker: Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP-IQ)
- Espectrofotômetro de infravermelho FTIR-8300 da Shimadzu: Os espectros de absorção no infravermelho, na região de 4.000 a 400 cm^{-1} , foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro Shimadzu.
- Ponto de Fusão Capilar “Electrothermal”: Foi utilizado para determinar as faixas de fusão, sem posterior correção.
- Cromatografia em Camada Delgada: Para acompanhamento das reações foi utilizada cromatografia em camada delgada (cromatofolhas de

alumínio 20x20 cm Sílica gel 60 F254 0,2 mm de espessura - Merck)

Resultados e Discussão

Síntese

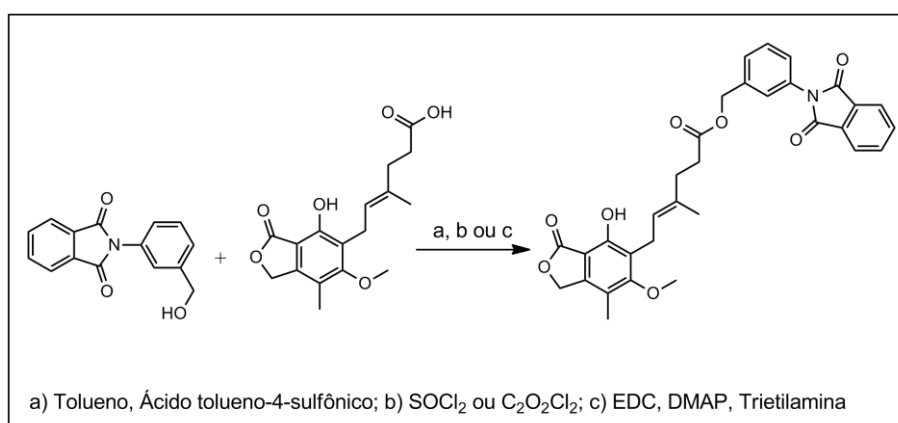


Figura 8: Metodologias sintéticas para obtenção de pró-fármacos de ácido micofenólico

A síntese de pró-fármacos de ácido micofenólico é descrita em artigos e patentes (neste caso, para a obtenção do micofenolato de mofetila).

Podemos dividir as metodologias empregadas na literatura em:

- Catálise em Tolueno
- Cloreto de Acila
- Agentes Acoplantes

A catálise em tolueno é a principal técnica industrial para obtenção do micofenolato de mofetila. Baseia-se na desidratação do meio reacional devido ao ponto de ebulição do tolueno ser de 110,45 °C

(KIRSHNAN, *et al.*, 1995), superior ao da água, permitindo retirá-la em nível laboratorial usando do Aparato de Dean-Stark. A reação de formação do micofenolato de mofetila acontece (84% de rendimento) mesmo na ausência de catalizadores (MOLNAR *et al.*, 2005). Contudo há uma série de catalizadores descritos, com ampla variedade de rendimentos.

A síntese via cloreto de acila visa converter o ácido micofenólico em uma molécula mais propensa à formação da ligação éster, devido ao grupo abandonador cloreto. A formação do cloreto de acila pode ser via a utilização de cloreto de tionila (BANG *et al.*, 2009; DAVE *et al.*, 2009) ou cloreto de oxalila (CHEN *et al.*, 2007). A formação do éster via cloreto de tionila, embora inesperado, apresentou menor rendimento quando utilizado 2-morfolinoetanoato de sódio (BANG *et al.*, 2009) do que quando utilizado 2-morfolinoetanol, sendo os rendimentos 69% e 91,6%, respectivamente.

Contudo a metodologia envolve a utilização de meios reativos fortemente ácidos, tornando possível a hidrólise do grupo lactona, prejudicando a obtenção do composto final.

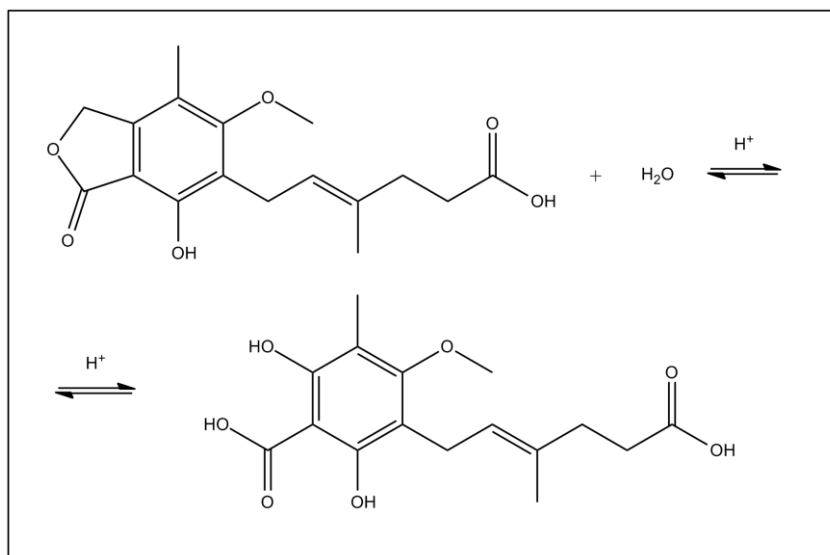


Figura 9: Reação de hidrólise do grupo lactona do ácido micofenólico em meio ácido

A utilização de agentes acoplantes permitem uma esterificação em meio anidro e a temperatura ambiente, sendo uma metodologia mais branda, protegendo o grupo lactona de uma possível hidrólise.

A utilização industrial deste método para obtenção do micofenolato de mofetila é descrita por ALLISON *et al.*, 1988 pela utilização de *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida.

Todavia, na literatura há metodologias de formação de ésteres e amidas de ácido micofenólico (que não o micofenolato de mofetila) utilizando agentes acoplantes como DPPA e o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (MALACHOWSKA-UGARTE, *et al.*, 2012).

A síntese do análogo estrutural da talidomida (“2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona”) foi planejada por duas vias: Por catálise em piridina, conforme proposto por SANTOS, *et al.* 2011, e por catálise

em ácido acético, como uma tentativa de eliminar o uso da piridina, substância com conhecida toxicidade (ATSDR, 1992).

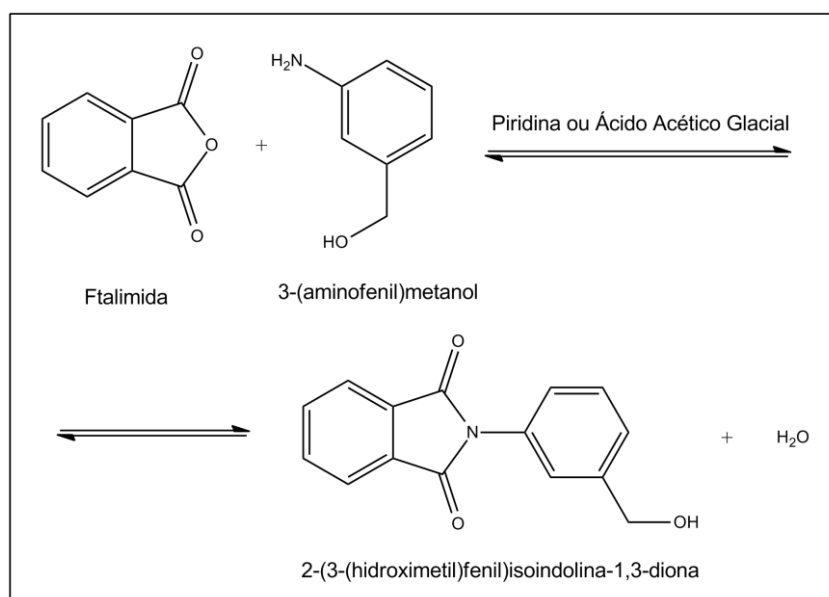


Figura 10: Síntese proposta para obtenção do “2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona”, baseado em SANTOS, et al., 2011.

A síntese do possível pró-fármaco recíproco (Produto Final) de ácido micofenólico e do análogo estrutural de talidomida (“2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona”), foi planejada baseado nos modelos propostos por LEE, *et al.* 1990 (via catálise por tolueno) e MALACHOWSKA-UGARTE, *et al.*, 2012 (via catálise por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, ou EDC). A síntese catalizada por cloreto de acila, embora potencialmente eficiente para a obtenção do produto final, foi desconsiderada por haver uma potencial hidrólise do grupo lactona devido ao meio fortemente ácido.

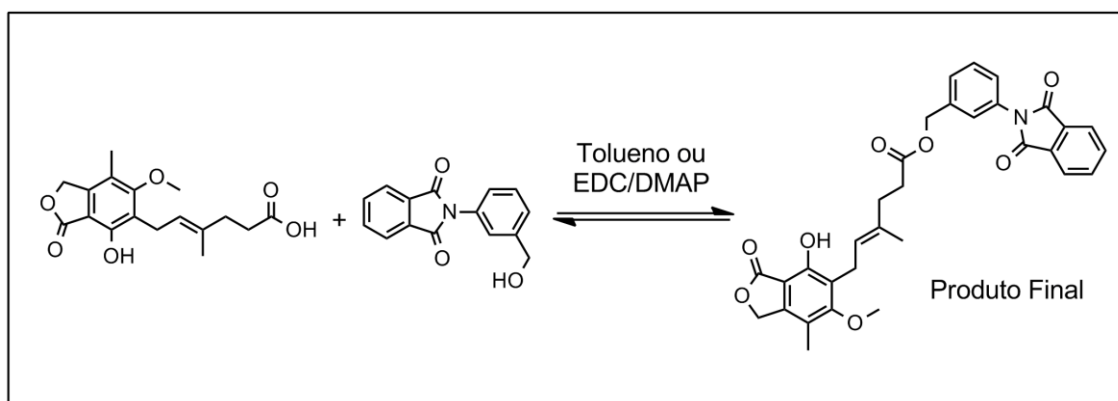
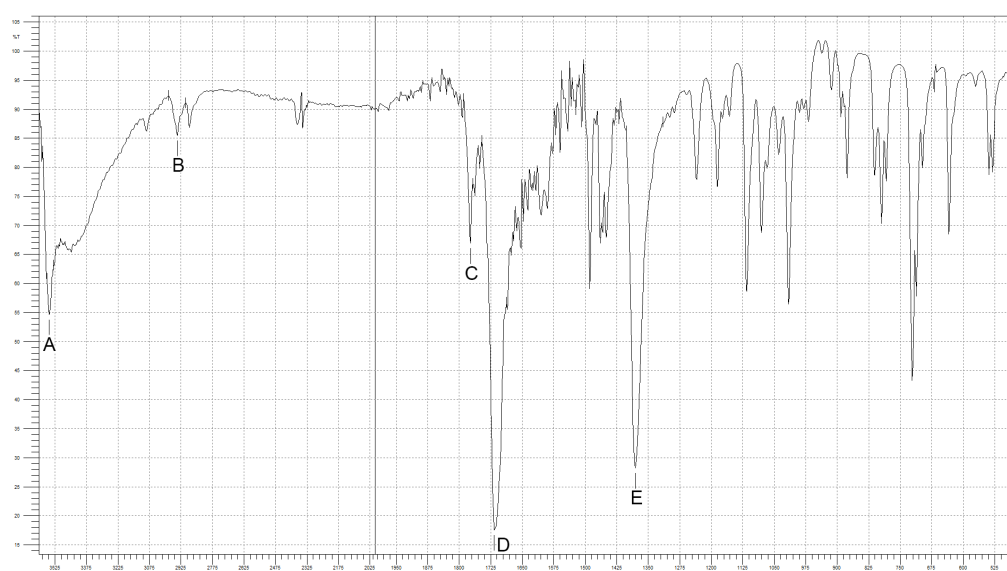


Figura 11: Síntese proposta para a obtenção do Produto Final, baseado em LEE, et al. 1990 e MALACHOWSKA-UGARTE, et al. 2012.

Caracterização Estrutural do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona obtida por catálise básica em piridina

A espectrofotometria no infravermelho do produto obtido está representada abaixo:



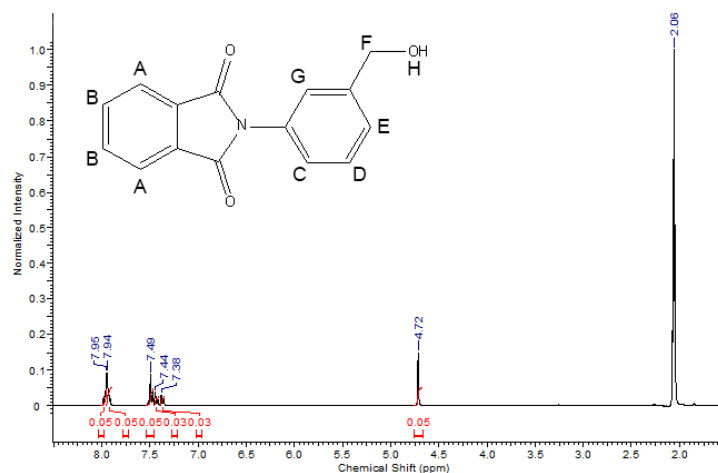
Espectro 1: Espectro no infravermelho do análogo estrutural de talidomida 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona (pastilha de KBr)

Marcador	V(1/cm)	Tipo de Deformação	Grupo Característico
A	3552,88	Axial	Álcool (-OH)
B	2941,44	Axial	Carbono Alifático (C-H)
C	1772,58	Axial	Carbonila (C=O)
D	1716,65	Axial	Carbonila (C=O)
E	1381,03	Axial	Amina Ligada ao Grupo Aromático (N-C ₆ H ₄)

Tabela 2: Absorção no infravermelho dos grupos funcionais do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona

Os principais funções observadas no espectro de infravermelho do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona são relativos ao grupo álcool (3552,88 1/cm) e a amina ligada ao grupo aromático (1381,03 1/cm). A ausência de absorção relativa a éster saturado (1735-1750 1/cm), anidrido (1700-1900 1/cm) ou ácido carboxílico (2400-3400 1/cm, sobreposto ao C-H) demonstra que a reação formou a ligação amida desejada, junto das absorções no grupo carbonila (1772,58 e 1716,65 1/cm), que demonstram a formação da ligação amida.

O espectro da Ressonância Magnética Nuclear - ¹H é apresentado abaixo.



Espectro 2: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona (RMN- ^1H ; 300 MHz, acetona- d_6).

RMN ^1H	δ (ppm)	Multiplicidade
A	7,94	Dubleto
B	7,95	Dubleto
C	7,44	Dubleto
D	7,49	Tripleto
E	7,38	Dubleto
F	4,72	Singlete
G	-	-
H	-	-
Acetona- d_6	2,06	Multiplete

Tabela 3: Deslocamento químico no espectro de RMN- ^1H do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona

O espectro de RMN- ^1H do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina não apresenta o deslocamento relativo ao álcool, singlete entre 2 e 5 ppm (ou a amina, siglete entre 1,5 e 4 ppm, que demonstraria a não obtenção do composto desejado). Contudo a espectrofotometria no infravermelho confirma a presença da função álcool. Os deslocamentos relativos ao grupo ftalimídico (7,94 e 7,95 ppm) e ao grupo aromático proveniente do 3-(aminofenil)metanol (7,38; 7,49 e 7,72 ppm) demonstram a obtenção do composto desejado.

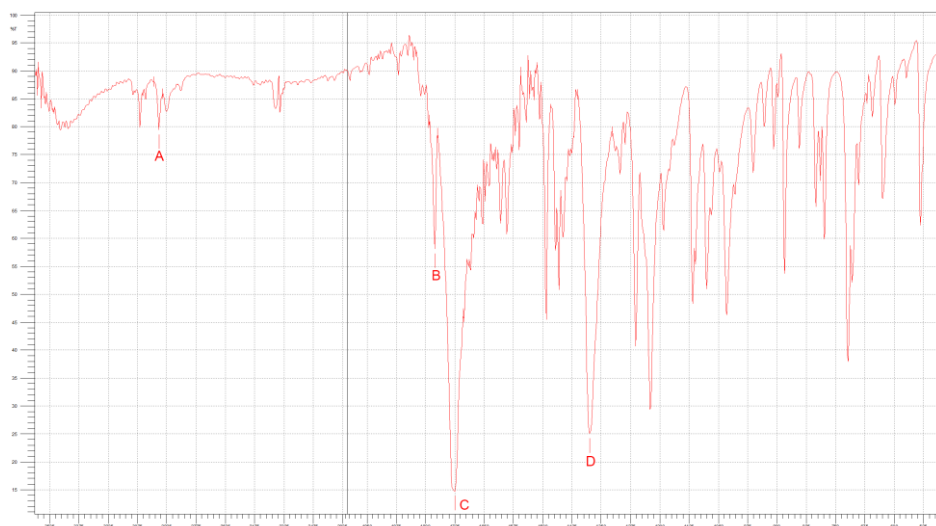
A C.C.D. foi nebulizada com ninidrina, reagente utilizado para detecção aminas terminais livres, e demonstrou que o produto não possui a função (O reagente 3-(aminofenil)metanol foi corado conforme o esperado).

O resultado do RMN-¹H, pode ter como explicação para a ausência do deslocamento do álcool a sobreposição do carbono alifático com deslocamento em 4,72 ppm. Outra possibilidade encontra-se na análise feita automaticamente pelo software de tratamento, que demonstra um deslocamento em 3,26 ppm de pouca intensidade.

Caracterização do acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila obtido por catálise ácida em ácido acético glacial

A metodologia sintética por catálise em ácido acético glacial obteve dois produtos distintos, o 2-(3-(hidroximetil)fenil)isindolina-1,3-diona (idêntico ao obtido pela síntese em piridina) e o acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila.

A espectrofotometria no infravermelho do acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila está representada a seguir:



Espectro 3: Espectro no infravermelho do acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila por catálise ácido em ácido acético glacial (pastilha de KBr)

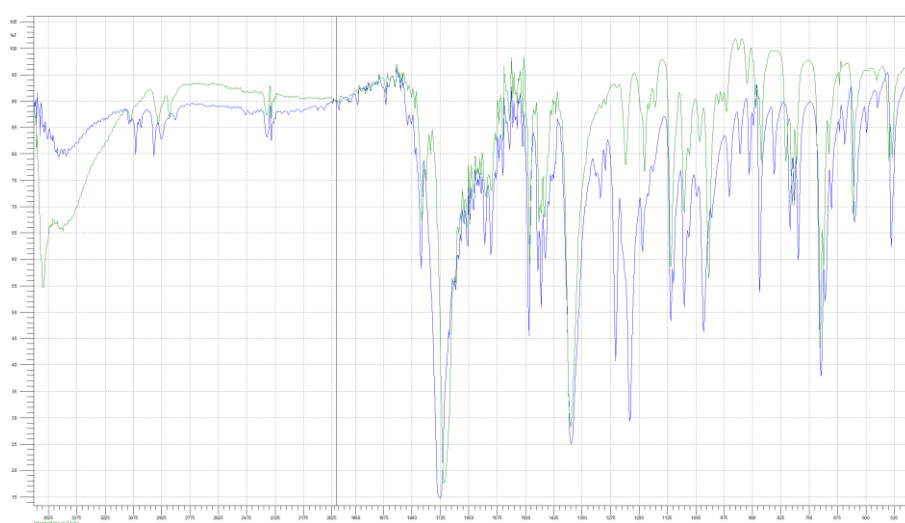
Marcador	V(1/cm)	Tipo de Deformação	Grupo Característico
A	2964,59	Axial	Carbono Alifático (C-H)
B	1776,44	Axial	Carbonila (C=O)
C	1724,36	Axial	Carbonila (C=O)
D	1379,10	Axial	Amina Ligada ao Grupo Aromático (N-C ₆ H ₄)

Tabela 4: Absorção no infravermelho dos grupos funcionais do acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila

A presença de absorção no infravermelho dos quatro grupos definidos na Tabela 3, demonstra de modo semelhante ao 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona, a presença da carbonila (1776,44 e 1724,36 1/cm⁻¹), formada pela ligação amida entre o 3-(aminofenil)metanol e o anidrido ftálico, da amina ligada ao anel aromático (1379,10 1/cm⁻¹) e do

carbono alifático em $2964,59\text{ cm}^{-1}$, indicando que os grupos funcionais esperados pela reação estão presentes no produto acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila.

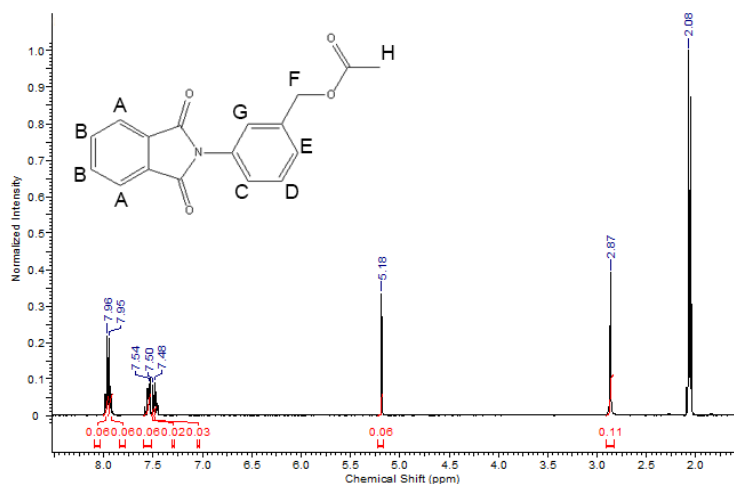
Contudo, é notável a ausência de uma absorção angular ou axial pronunciada entre 2700 e 3600 cm^{-1} , que seria relativo a absorção de grupos amina ou álcool, o que indica a ausência destes grupos livres no produto.



Espectro 4: Comparação por sobreposição entre os espectros do acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila (em azul) e o 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona (em verde)

Contudo, devido aos resultados obtidos pelo espectro de RMN- ^1H , foi possível determinar a estrutura molecular do acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila.

O espectro de RMN- ^1H do acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila é apresentado a seguir:



Espectro 5: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do produto acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila (RMN- ^1H ; 300 MHz, acetona- d_6).

RMN ^1H	δ (ppm)	Multiplicidade
A	7,95	Dubleto
B	7,96	Dubleto
C	7,50	Dubleto
D	7,54	Tripleto
E	7,48	Dubleto
F	5,18	Singlete
G	-	-
H	2,87	Singlete
Acetona- d_6	2,08	Multiplete

Tabela 5: Deslocamento químico no espectro de RMN- ^1H do acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila.

Assim como o obtido em 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona, podemos observar a presença de deslocamentos relativos a porção ftalimídica (7,95 e 7,96 ppm) e ao anel aromático proveniente do 3-(aminofenil)metanol (7,50; 7,54 e 7,48 ppm) e do carbono alifático em 5,18 ppm.

O deslocamento singlete em 2,87 ppm, que não se apresenta no produto 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona, poderia representar o grupo hidroxila do produto desejado, uma vez que encontra-se na faixa de deslocamento respectiva. Contudo entre outras possibilidades encontram-se: Deslocamento relativo a água residual no produto ou nos solventes (acetona- d_6) e deslocamento relativo ao carbono de um ácido acético, esterificado na molécula.

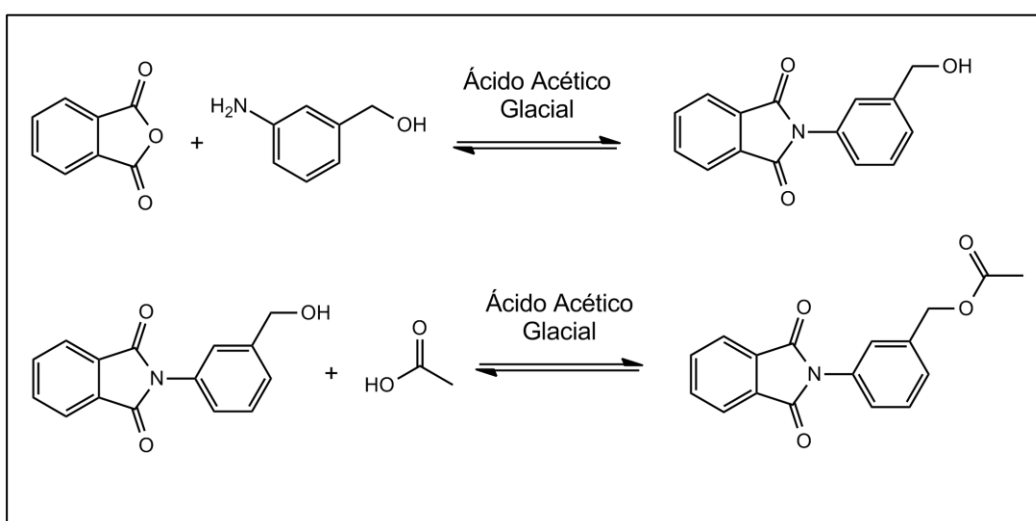


Figura 12: Proposta de mecanismo para esterificação do grupo álcool e formação do produto acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila

A presença de água foi descartada ao observar que ambos produtos não apresentam absorção axial característico de água. O produto 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona que apresenta uma absorção na região relativa, podendo representar água no produto. Todavia o produto acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila não apresenta absorção na mesma região, permitindo ao menos eliminar a presença de água no KBr usado para análise.

O deslocamento em 2,87 ppm no produto acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila não pode ser relativo a água no solvente, uma vez que não está presente em 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona. Uma vez que o infravermelho confirma a ausência de água no produto acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila e o RMN-¹H exclui a presença de água no produto 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona, podemos excluir o deslocamento como relacionado a água.

Síntese por catálise em tolueno

A metodologia sintética de ésteres de ácido micofenólico, baseada na catálise em tolueno, foi realizada baseada no proposto por Molnar *et al.* (2005), utilizando no meio reacional o catalizador ácido tolueno-4-sulfônico monohidratado, além dos reagentes e do tolueno.

Para determinar a eficiência do método, utilizou-se a *N*-(2-hidroxietil)ftalimida, ao invés do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona, que precisaria ser sintetizado para utilizar na reação. A *N*-(2-hidroxietil)ftalimida possui estrutura molecular semelhante a talidomida e o 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona, sendo também um análogo estrutural.

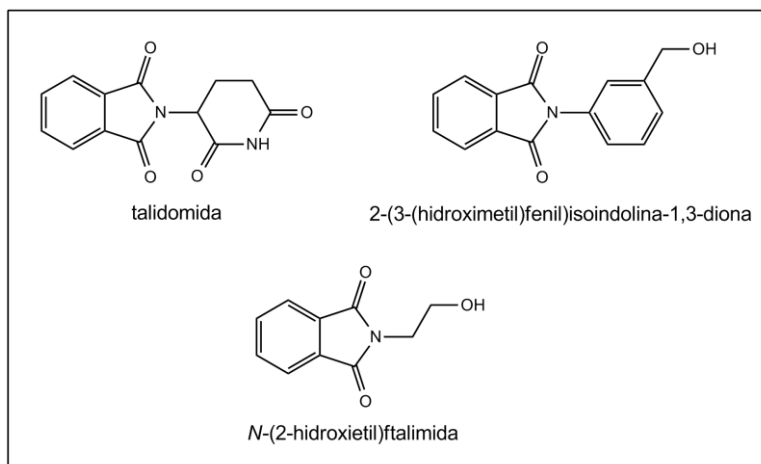


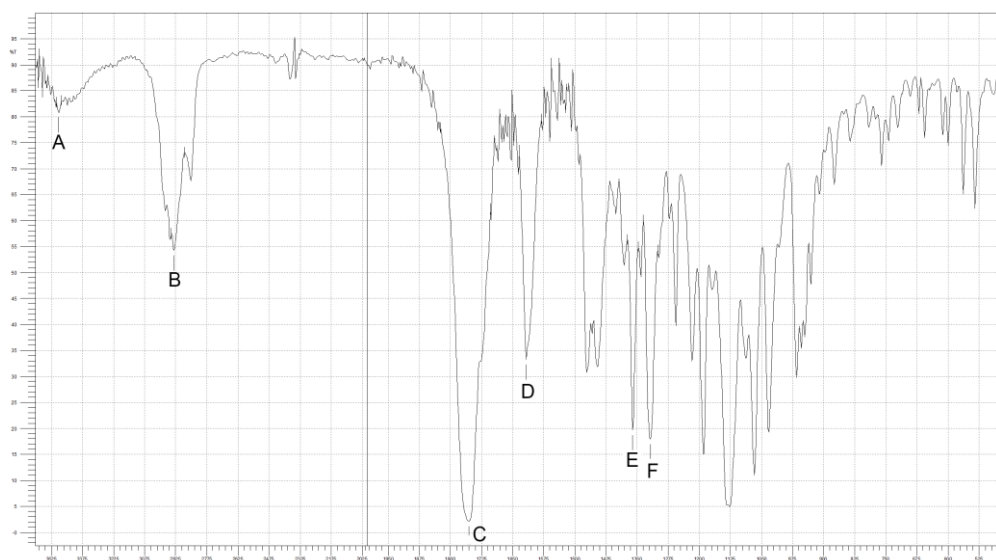
Figura 13: Comparativo estrutural entre a talidomida e os análogos do estudo.

Embora a reação tenha demonstrado a formação de um produto, seu rendimento foi inferior a 10 mg de produto (aproximadamente 1,3%), sendo uma quantidade inferior a necessária para a análise e rendimento demasiado baixo.

Assim, a metodologia por catálise em tolueno considerada imprópria para o trabalho apresentado.

Caracterização do Produto Final obtido por agente acoplante

A espectrofotometria no infravermelho do Produto Final está representada a seguir:



Espectro 6: Espectro no infravermelho do produto final por agente acoplante (pastilha de KBr)

Marcador	V(1/cm)	Tipo de Deformação	Grupo Característico
A	3489,23	Angular	Fenol
B	2933,73	Axial	C-H sp ³
C	1755,22	Axial	Carbonila (C=O)
D	1616,35	Axial	C=C
E	1359,82	Axial	Amina Ligada ao Grupo Aromático (N-C ₆ H ₄)
F	1317,38	Axial	C-O

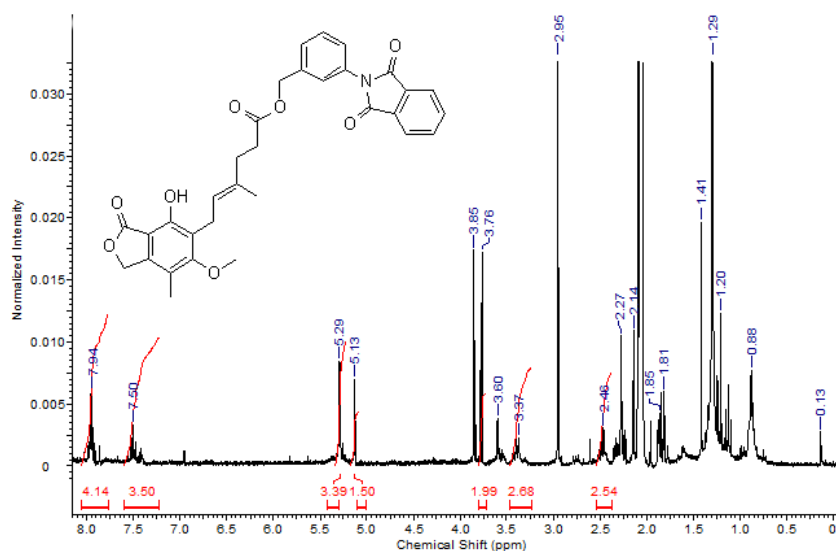
Tabela 6: Absorção no infravermelho dos grupos funcionais do Produto Final

A absorção no infravermelho em 1359,82 1/cm demonstra a presença de uma amina ligada a um grupo aromático, demonstrando que o produto final contém o grupo amina pertencente ao 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona.

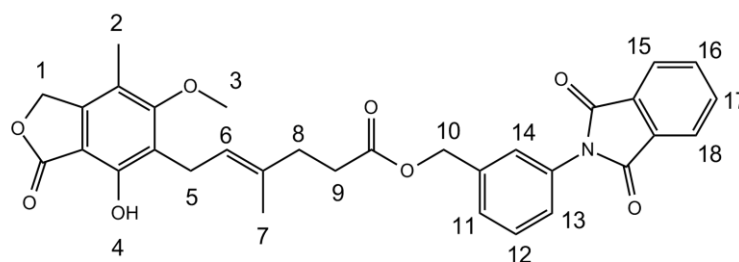
As absorções em 3489,23 1/cm e 1616,35 1/cm demonstram a presença de grupos fenol e ligação dupla carbono-carbono, pertencentes ao ácido micofenólico. A absorção em 2933,73 1/cm indica a presença das ligações saturadas entre carbono-hidrogênio.

A ligação éster formada entre o 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona e o ácido micofenólico são determinadas pela absorção em 1755,22 1/cm, que é característica da ligação éster.

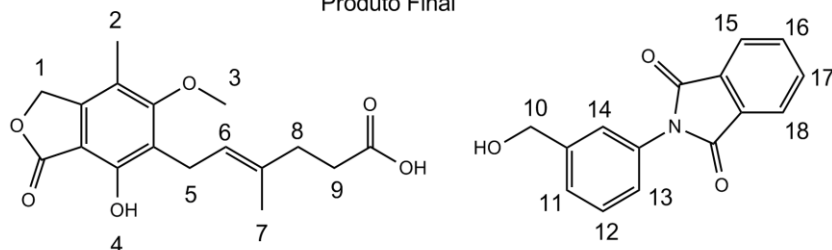
O espectro de RMN-¹H do Produto Final é apresentado a seguir:



Espectro 7: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do Produto Final (RMN-¹H; 300 MHz, acetona-d₆).



Produto Final



ácido micofenólico

2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona

RMN ¹ H	δ (ppm) do Produto Final	Multiplicidade	δ (ppm) do ácido micofenólico	δ (ppm) da 2-(3- (hidroximetil)fenil)isoindoli na-1,3-diona
1	5,29	Singlete	5,20	-
2	2,14	Singlete	2,15	-
3	3,76	Singlete	3,76	-
4	-	-	-	-
5	3,37	Dubleto	3,39	-
6	5,27	Múltiplo	5,27	-
7	1,81	Singlete	1,81	-
8	2,27	Múltiplo	2,33	-
9	2,46	Múltiplo	2,45	-
10	5,13	Singlete	-	4,72
11	7,50	Múltiplo	-	7,38
12	7,50	Múltiplo	-	7,49
13	7,50	Múltiplo	-	7,44
14	7,50	Múltiplo	-	-
15	7,94	Múltiplo	-	7,94
16	7,94	Múltiplo	-	7,95
17	7,94	Múltiplo	-	7,95
18	7,94	Múltiplo	-	7,94

Tabela 7: Comparativo do deslocamento químico no espectro de RMN-¹H entre o Produto Final, 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona e ácido micofenólico

No comparativo entre os deslocamentos químicos dos reagentes (ácido micofenólico e 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona e ácido micofenólico, pode-se observar que o hidrogênio 10 sofre uma desproteção eletrônica, alterando o deslocamento de 4,72 ppm para 5,13 ppm devido ao grupo carboxila formado pela esterificação entre os reagentes.

Os hidrogênios do anel aromático dissustituído se apresentam em multipeto em 7,50 ppm, e os hidrogênios da porção ftalimídica em 7,94 ppm multipeto, semelhante ao observado no 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona, demonstrando que o Produto Final possui os hidrogênios provenientes da 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona.

O deslocamento em 5,29 ppm evidencia a presença do grupo lactona. Em 5,27 ppm, o deslocamento químico é relativo ao hidrogênio ligado ao carbono insaturado. Em 3,76 ppm observa-se o deslocamento do hidrogênio do grupo éster e em 1,81 ppm, há o deslocamento relativo ao hidrogênio do grupo metil ligado a instauração. Estes deslocamentos são relativos a estrutura do ácido micofenólico, o que demonstra a obtenção do pró-fármaco recíproco.

Na análise do espectro de RMN-¹H do Produto Final é possível observar a presença de deslocamentos não relacionados à molécula proposta, sendo possivelmente devido a presença de agente acoplante não visível na cromatografia de camada delgada. Isto implica na necessidade de procurar melhores métodos de isolamento do Produto Final.

Conclusão

Este trabalho permitiu a síntese e a caracterização, por absorção no infravermelho e por deslocamento químico no RMN-¹H, de um análogo estrutural de talidomida e, pela técnica de latenciação, foi obtido um possível pró-fármaco com propriedades inibidoras da Inosina 5'-monofosfato desidrogenase e da produção de TNF- α em monócitos, permitindo uma possível superior atividade imunossupressora para tratamento de reações de hipersensibilidade e para pacientes em transplante de órgãos. As novas moléculas serão posteriormente avaliadas em modelos *in vitro* e *in vivo* para determinação de sua atividade imunossupressora para as condições que se propõe abordar.

Bibliografia

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; MBBS, S. P. **Imunologia Celular e Molecular**. 6^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABERER, W. *et al.* Azathioprine in the treatment of pemphigus vulgaris: A long-term follow-up. **Journal of the American Academy of Dermatology**. Washington, 16, n. 1, Março 1987. 527-533.

ADAMS, C. P.; BRANTNER, V. V. Estimating the cost of new drug development: Is it really \$802 million?. **Health Affairs**, Bethesda, 25, n. 2, Março-Abril 2006. 420-428.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Nota Sobre Indeferimento da lenalidomida. **Portal ANVISA**, 28 Dezembro 2012. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-](http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/nota+sobre+indeferimento+da+lenalidomida)

+noticias+anos/2012+noticias/nota+sobre+indeferimento+da+lenalidomida>.

Acesso em: 1 Outubro 2013.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, Toxicological Profile for Pyridine, 1992. Disponível em <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp52.pdf>>, Acesso em 02 de Outubro de 2013.

AHMED, A. R. *et al.* Treatment of Pemphigus Vulgaris with Rituximab and Intravenous Immune Globulin. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, 355, n. 17, 26 Outubro 2006. 1772-1779.

ALLISON, A. C.; EUGUI, E. M. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. **Immunopharmacology**, Amsterdam, 47, n. 2-3, Maio 2000. 85-118.

ALLISON, A. C. *et al.*, Morpholinoethylesters of mycophenolic acid and pharmaceutical compositions, US4753935 A, 28 de Junho de 1988.

ARMENTI, V. T. *et al.* Pregnancy After Transplantation. **Transplantation Reviews**, Amsterdam, 22, n. 4, Outubro 2008. 223-240.

ARZOO, K.; SADEGHI, S.; LIEBMAN, H. A. Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab). **Annals of the Rheumatic Diseases**. Londres, 61, n. 10, Outubro 2002. 922-924.

ASHRY, E. S. H. E. *et al.* Acyclic Analogues of Glucosamidine, 1-deoxynojirimycin and N-(1,3-dihydroxyprop-2-yl) Derivative of Valiolamine as Potential Glucosidase Inhibitors. **Tetrahedron**, Amsterdam, 55, n. 8, 19 Fevereiro 1999. 2381-2388.

BALDWIN III, W. M.; P., L. C.; FAIRCHILD, R. L. Innate Immune Responses to Transplants: A Significant Variable with Cadaver Donors. **Immunity**, Maryland Heights, 14, n. 4, Abril 2001. 369-376.

BANG, S. H. *et al.*, Improved Process for Preparing mycophenolate mofetil, WO2009096668 A2, 9 de Agosto de 2009.

BENTLEY, R. Mycophenolic Acid: A One Hundred Year Odyssey from Antibiotic to Immunosuppressant. **Chemical Reviews**, Washington, 100, n. 10, 11 Outubro 2000. 3801-3826.

BIRKINSHAW, J. H.; RAISTRICK, H.; ROSS, D. J. Studies in the biochemistry of micro-organisms. 86. The molecular constitution of mycophenolic acid, a metabolic product of *Penicillium brevi-compactum* Dierckx. Part 3. Further observations on the structural formula for mycophenolic acid. **Biochemical Journal**, Londres, 50, n. 5, Março 1952. 630-634.

BORGES, L. G.; FRÖEHLICH, P. E. Talidomida - Novas Perspectivas Para Utilização como Antiinflamatório, Imunossupressor e Antiangiogênico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, 49, n. 1, Janeiro 2003. 96-102.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 11, de 22 de Março de 2011 - Dispõe sobre o controle da substância talidomida e do medicamento que a contenha.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº64, de 28 de Dezembro de 2012 – Publica a Lista das Denominações Comuns Brasileiras

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas – Síndrome de Guillain-Barré – Portaria SAS/MS nº 497, de 23 de Dezembro de 2009.

BRYNSKOV, J. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of cyclosporine therapy in active chronic Crohn's disease. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, 321, n. 13, 28 Setembro 1989. 845-850.

BURGIO, G. R. The Talidomide Disaster Briefly Revisited. **European Journal of Pediatrics**, Heidelberg, 136, n. 3, Julho 1981. 229-230.

CACCAVO, D. *et al.* Long-term treatment of systemic lupus erythematosus with cyclosporin A. **Arthritis and Rheumatism**, Haboken, 40, n. 1, Janeiro 1997. 27-35.

CHA, M.; RIFAI, B.; SARRAF, P. Pharmaceutical forecasting: throwing darts?. **Nature Reviews Drug Discovery**, Londres, 12, n. 10, 1 Outubro 2013. 737-738.

CHATENOUD, L.; BLUESTONE, J. A. CD3-Specific Antibodies: A Portal to the Treatment of Autoimmunity. **Nature Reviews Immunology**, Londres, 7, Agosto 2007. 622-632.

CHAULET, C. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of new thalidomide analogues as TNF-alpha and IL-6 production inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Amsterdam, 21, n. 3, 1 Fevereiro 2011. 1019-1022.

CHEN, M.; DAHA, M. R.; KALLENBERG, C. G. M. The complement system in systemic autoimmune disease. **Journal of Autoimmunity**, Amsterdam, 34, n. 3, Maio 2010. J276-J286.

CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. O Processo de Latenciação no Planejamento de Fármacos. **Química Nova**, São Paulo, 22, n. 1, Fevereiro 1999. 75-84.

CHUNG, M. C. *et al.* Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, 41, n. 2, Junho de 2005. 155-179.

COLVIN, R. B.; SMITH, R. N. Antibody-Mediated Organ-Allograft Rejection. **Nature Reviews Immunology**, Londres, 5, Outubro 2005. 807-817.

COLOMBEL, J. *et al.* The safety profile of infliximab in patients with Crohn's disease: The Mayo Clinic experience in 500 patients. **Gastroenterology**, Amsterdam, 126, n. 1, Janeiro 2004. 19-31.

COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The Anti-Inflammatory and Immunosuppressive Effects of Glucocorticoids, Recent Developments and Mechanistic Insights. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, 335, n. 1, 15 Março 2011. 2-13.

DALL'ERA, M. Mycophenolate mofetil in the treatment of systemic lupus erythematosus. **Current Opinion in Rheumatology**, Londres, 23, n. 5, Setembro 2011. 454-458.

DAVE, M. G. *et al.*, Process for Preparing mycophenolate mofetil, WO2009084008 A1, 9 de Julho de 2009.

DICKSON, M.; GAGNON, J. P. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, Londres, 3, n. 5, Maio 2004. 417-429.

DRACHMAN, D. B. Myasthenia Gravis. **The New England Journal of Medicine**. Waltham, 330, n. 24, 23 Junho 1994. 1797-1810.

EPSTEIN, F. H. Pernicious Anemia. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, 337, n. 20, 13 Novembro 1997. 1441-1448.

EMERY, P. The Efficacy and Safety of Rituximab in Patients With Active Rheumatoid Arthritis Despite Methotrexate Treatment. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Amsterdam, 54, n. 5, Maio 2006, 1390-1400.

ENK, A. H.; KNOP, J. Mycophenolate is effective in the treatment of pemphigus vulgaris. **Archives of Dermatology**. Chicago, 135, n.1, Janeiro 1999. 54-56.

EUROPEAN MYCOPHENOLATE MOFETIL COOPERATIVE STUDY GROUP. Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection. **The Lancet**, Londres, 345, n. 8961, 27 Maio 1995. 1321-1325.

FEUCHT, H. E. *et al.* Vascular Deposition of Complement-Split Products in Kidney Allografts With Cell-Mediated Rejection. **Clinical & Experimental Immunology**, Londres, 86, n. 3, Dezembro 1991. 464-470.

FELDMAN, A. M.; MCNAMARA, D. Myocarditis. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, 343, n. 19, 9 Novembro 2000. 1388-1398.

FERREIRA, E. I.; KOROLKOVAS, A. Pró-Fármacos e Latenciação. **Química Nova**. São Paulo, 3, n.3, Julho 1980. 113-128.

FICKERT, P. *et al.* Mycophenolate mofetil in patients with Crohn's disease. **The American Journal of Gastroenterology**, Londres, 93, n. 12, Dezembro 1998. 2529-2532.

FISHMAN, J. A.; RUBIN, R.H. Infection in Organ-Transplant Recipients. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, 338, n. 24, 11 Junho 1998. 1741-1751.

FLOREY, H. W. *et al.* Mycophenolic Acid an Antibiotic From *Penicillium brevicompactum* dierckx. **The Lancet**, Amsterdam, 247, n. 6385, 12 Janeiro 1946. 46-49.

FUSAR-POLI, P. *et al.* Anti-depressive Therapies After Heart Transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, Addison, 25, n. 7, 7 Julho 2006.

GARCÍA-CANTON, C. *et al.* Goodpasture's syndrome treated with mycophenolate mofetil. **Nephrology Dialysis Transplantation**. Oxford, 15, n. 6, Junho 2000. 920-922.

GARSSEN, M. P. J.; VAN KONINGSVELD, R.; VAN DOORN, P. A. Treatment of Guillain–Barré syndrome with mycophenolate mofetil: a pilot study. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, Londres, 78, n. 9, Setembro 2007. 1012-1013.

GOLDENBERG, M. M. Multiple Sclerosis Review. **Pharmacy and Therapeutics**. Amsterdam, 37, n. 3, Março 2012. 175-184.

GOLDBLUM, R. Therapy of rheumatoid arthritis with mycophenolate mofetil. **Clinical and Experimental Rheumatology**, 11, suplemento 8, Março-Abril 1993. 117-119.

HALLORAN, P. F. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. **The New England Journal of medicine**, Waltham, 351, n. 26, 23 Dezembro 2004. 2715-2729.

HARIHARAN, S. *et al.* Improved Graft Survival After Renal Transplantation in the United States, 1988 to 1996. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, 342, n. 9, 2 Março 2000. 605-612.

JANA, S.; MANDLEKAR, S.; MARATHE, P. Prodrug Design to Improve Pharmacokinetic and Drug Delivery Properties: Challenges to the Discovery

Scientists. **Current Medicinal Chemistry**, Oak Park, 17, n. 32, 2010. 3874-3908.

JINDAL, K. K. Management of idiopathic crescentic and diffuse proliferative glomerulonephritis: Evidence-based recommendations. **Kidney International**. Londres, 70, Junho 1999. S33-40.

KALISH, R. S.; ASKENASE, P. W. Molecular mechanisms of CD8+ T cell-mediated delayed hypersensitivity: Implications for allergies, asthma, and autoimmunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, Amsterdam, 103, n. 2, Fevereiro 1999. 192-199.

KARAMINIA, R. *et al.* Anxiety and Depression: A Comparison Between Renal Transplant Recipients and Hemodialysis Patients. **Transplantation Proceedings**, Montreal, 34, n. 4, 4 Maio 2007. 1082-1084.

KASISKE, B. L. *et al.* Cardiovascular Disease After Renal Transplantation. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, 7, n. 1, 1 Janeiro 1996. 158-165.

KELLER, H.; KUNZ, W. **Products of the amino-piperidine-2-6-dione series**. U.S. Pat.2.830.991, 15 Abril 1958.

KIRSHNAN, K. M. *et al.* Excess Volumes and Speed of Sound of Ternary Mixtures of 2-Methoxyethanol (1) + Butyl Acetate (2) + Aromatic Hydrocarbons (3) at 303.15 K. **Journal of Chemical & Engineering Data**, Washington, 40, n. 1, Janeiro 1995. 128-131.

LEBRUN, C. *et al.* Successful treatment of refractory generalized myasthenia gravis with rituximab. **European Journal of Neurology**. Vienna, 16, n. 2, Fevereiro 2009. 246-250.

LECHNER, K.; JÄGER, U. How I treat autoimmune hemolytic anemias in adults. **Blood**, Washington, 116, n. 11, 16 de Setembro de 2010. 1831-1838

LEE, W. A. *et al.* Bioavailability Improvement of Mycophenolic Acid Through Amino Ester Derivatization. **Pharmaceutical Research**, Berlin, 7, n. 2, Fevereiro 1990. 161-166.

LEIB, E. S.; RESTIVO, C.; PAULUS, H. E. Immunosuppressive and corticosteroid therapy of polyarteritis nodosa. **The American Journal of Medicine**, Amsterdam, 67, n. 6, Dezembro 1979. 941-947.

LEVER, W. F.; SCHAUMBURG-LEVER, G. Immunosuppressants and prednisone in pemphigus vulgaris: therapeutic results obtained in 63 patients between 1961 and 1975. **Archives of Dermatology**. Chicago, 113, n. 9, Setembro 1977. 1236-1241.

LIMA, L. M. *et al.* Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Phthalimide Derivatives, Designed as New Thalidomide Analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Amsterdam, 10, n. 9, Setembro 2002. 3067-3073.

LOCKWOOD, C. M. *et al.* Immunosuppression and plasma-exchange in the treatment of goodpasture's syndrome. **The Lancet**. Amsterdam, 307, n. 7962, 2 Abril 1976. 711-715.

LUIJTEN, R. K. M. A. C. *et al.* The use of glucocorticoids in Systemic Lupus Erythematosus. After 60 years still more an art than science. **Autoimmune Reviews**. Amsterdam, 12, n. 5, Março 2013. 617-628.

MACHADO, A. L. *et al.* Design, Synthesis and Antiinflammatory Activity of Novel Phthalimide Derivatives, Structurally Related to Thalidomide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Amsterdam, 15, n. 4, 15 Fevereiro 2005. 1169-1172.

MALACHOWSKA-UGARTE, M. *et al.* Synthesis and biological activity of novel mycophenolic acid conjugates containing nitro-acridine/acridone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdam, 54, Agosto 2012. 197-201.

MOLNAR, S. *et al.*, Process for Preparation of mycophenolate mofetil and other esters of mycophenolic acid, US20050250773 A1, 10 de Novembro de 2005.

NASR, S. H. *et al.* Proliferative glomerulonephritis with monoclonal IgG deposits. **Journal of the American Society of Nephrology**. Washington, 20, n. 9, Setembro 2009. 2055-2064.

OECKINHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF- κ B Signaling Pathways. **Nature Immunology**, Londres, 12, n. 8, 19 Julho 2011. 695-708.

OJO, A. O. *et al.* Long-Term Survival in Renal Transplant Recipients with Graft Function. **Kidney International**, Londres, 57, Janeiro 2000. 307-313.

PALLADINO, M. A. *et al.* Anti-TNF- α Therapies: The Next Generation. **Nature Reviews Drug Discovery**, Londres, 2, Setembro 2003. 736-746.

PETRI, M. Cyclophosphamide: New Approaches for systemic lupus erythematosus. **Lupus**. Thousand Oaks, 13, n. 5, 2004. 366-371.

PROVAN, D. *et al.* Efficacy of Mycophenolate Mofetil as Single-Agent Therapy for Refractory Immune Thrombocytopenic Purpura. **American Journal of Hematology**. Nova Iorque, 81, n. 1, Janeiro 2006. 19-25.

RAHMAN, A.; ISENBERG, D. A. Systemic Lupus Erythematosus. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, 358, n. 9, 28 Fevereiro 2008. 929-939.

RAUTIO, J. *et al.* Prodrugs: design and clinical applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, Londres, 7, n. 3, Março 2008. 255-70.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, 353, 20 Outubro 2005. 1711-1723.

ROBAK, E.; ROBAK, T. Monoclonal Antibodies in the Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. **Current Drug Targets**. Oak Park, 10, n. 1, Janeiro 2009. 26-37.

RODEGHIERO, F. *et al.* Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. **Blood**. Washington, 113, n.11, 12 de Março de 2009. 2386-2393

ROGERS, N. J.; LECHLER, R. I. Allorecognition. **American Journal of Transplantation**, Mount Laurel, 1, n. 3, Julho 2001. 97-102.

RUDGE, P. *et al.* Randomised double blind controlled trial of cyclosporin in multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, Londres, 52, n. 2, Maio 1989. 559-565.

RUTGEERTS, P. *et al.* A comparison of budesonide with prednisolone for active crohn's disease. **The New England Journal of Medicine**, London, 331, n. 13, 29 Setembro 1994. 842-845.

SAMPAIO, E. P. *et al.* Thalidomide Selectively Inhibits Tumor Necrosis Factor ac Production by Stimulated Human Monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, Nova Iorque, 173, n. 3, 1 Março 1991. 699-703.

SANTOS, J. L. *et al.* Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel Hybrid Compounds To Treat Sickle Cell Disease Symptoms. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, 54, n. 16, 25 Agosto 2011. 5811-5819.

SHMAGEL, K. V.; CHERESHNEV, V. A. Molecular bases of immune complex pathology. **Biochemistry**, Moscow, 74, n. 5, Maio 2009. 469-479.

SMITH, R. M.; JONES, R. B.; JAYNE, D. R.; Progress in treatment of ANCA-associated vasculitis. **Arthritis Research and Therapy**, London, 12, n.2, 30 Abril 2012. 210

STANWORTH, D. R. Immunochemical mechanisms of immediate-type hypersensitivity reactions. **Clinical and Experimental Immunology**, Londres, 6, n. 1, Janeiro 1970. 1-12.

SUGAWARA, H. *et al.* Paradoxical Depression in Renal Transplant Recipients. **Transplantation Proceedings**, Montreal, 40, n. 10, 10 Dezembro 2008. 3448-3450.

TAKEMOTO, S. K. *et al.* National Conference to Assess Antibody-Mediated Rejection in Solid Organ Transplantation. **American Journal of Transplantation**, Mount Laurel, 4, n. 7, 1 Julho 2004. 1033-1041.

TAN, M. H.; MCMANUS, R. Is Insulin-Dependent Diabetes Mellitus an Autoimmune Disorder?. **Canadian Family Physician**, Ontario, 33, Fevereiro 1987. 389-392.

TUGWELL, P. *et al.* Combination Therapy with Cyclosporine and Methotrexate in Severe Rheumatoid Arthritis. **The New England Journal of Medicine**. Whaltam, 333, n.3, 20 Julho 1995. 137-41.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiological Reviews**. Bethesda, 91, n. 1, Janeiro 2011. 79-118.

VERT, M. *et al.* Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**. Research Triangle Park, 84, n.2, Janeiro 2012. 377-410.

WAAGA, A. M. *et al.* Mechanisms of Chronic Rejection. **Current Opinion in Immunology**, Londres, 12, n. 5, 1 Dezembro 2000. 517-521.

WARTOFSKY, L. *et al.* Differences and Similarities in the Diagnosis and Treatment of Graves' Disease in Europe, Japan, and The United States. **THYROID**, New Rochelle, 1991, 1, n. 2, 1991.129-35.

WEETMAN, A. P. Graves' Disease. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, 343, n. 17, 26 Outubro 2000. 1236-1248.

WEISS, M. M. Corticosteroids in rheumatoid arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Amsterdam, 19, n. 1, Agosto 1989. 9-21.

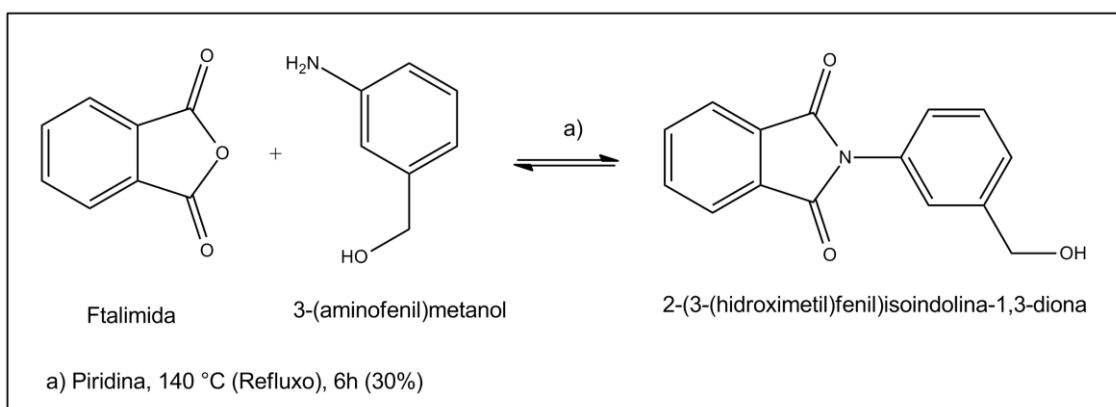
WOLFE, R. A. *et al.* Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, 341, n. 23, 2 Dezembro 1999. 1725-1730.

Anexos

Todos os procedimentos sintéticos dos produtos obtidos, bem como isolamento, faixa de fusão, fator de retenção em Cromatografia em Camada Delgada e rendimento da reação serão apresentados nessa seção. Para fim didáticos, o esquema sintético da obtenção dos produtos será representado.

A) Procedimento Sintéticos

1 – Síntese do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona por catálise em piridina

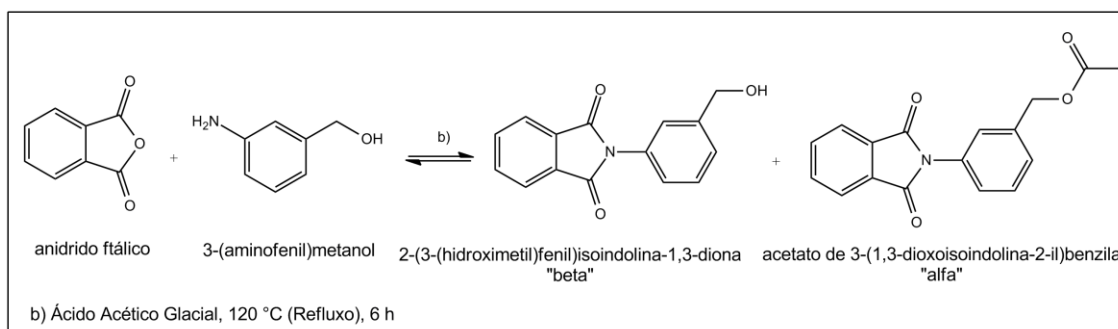


O processo de obtenção do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona, baseado na metodologia sintética de SANTOS, *et al.* 2011, envolveu adicionar em um balão de fundo redondo (50 mL): 0,6 g (4,04 mmol) de anidrido ftálico, 0,54 g (4,04 mmol) de 3-(aminofenil)metanol e 10 mL de piridina. O balão foi mantido em refluxo (140 °C), sob agitação magnética constante por 6 horas. O monitoramento da reação foi realizado por Cromatografia de Camada Delgada, utilizando como fase móvel 50% Acetato de Etila e 50% Hexano.

Para a purificação do produto final foi realizada após o sistema reacional resfriar à temperatura ambiente. A mistura reacional foi evaporada na capela com exaustão ligada, formando uma massa amarelada. A massa foi então diluída em 50 mL de diclorometano e lavada múltiplas vezes com uma solução saturada de sulfato de cobre, até a solução não apresentar mudança de cor, devido a formação de um quelato entre o cobre e a piridina. Após a lavagem com a solução, realiza-se uma segunda lavagem com água destilada para total retirada do sulfato de cobre na fase orgânica. Então utiliza-se sulfato de sódio como agente secante da fase orgânica, que é filtrada, seca e evaporada por pressão reduzida, obtendo-se um sólido branco.

A pureza do sólido foi verificada por C.C.D., obtendo-se um Fator de Retenção (RF) de 0,375, sem contaminantes aparentes, Faixa de Fusão de: 145-149 °C e rendimento de 30%.

2 – Síntese do 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona por catálise em ácido acético glacial



A metodologia por catálise em ácido acético glacial envolveu adicionar em um balão de fundo redondo (50 mL): 0,6 g (4,04 mmol) de anidrido ftálico, 0,54 g (4,04 mmol) de 3-(aminofenil)metanol e 10 mL de ácido

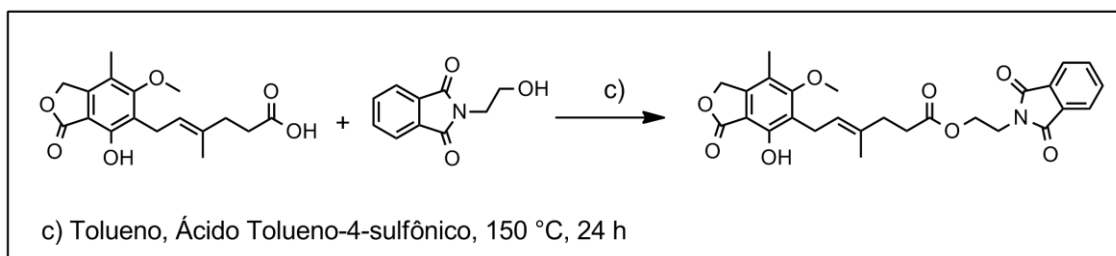
acético glacial. O balão foi mantido em refluxo sob agitação magnética constante por 6 horas. O monitoramento da reação foi realizado por Cromatografia de Camada Delgada, utilizando como fase móvel 50% Acetato de Etila e 50% Hexano.

A mistura reacional foi então retirada do aquecimento, até resfriar a temperatura ambiente. O ácido foi retirado por evaporação a pressão reduzida.

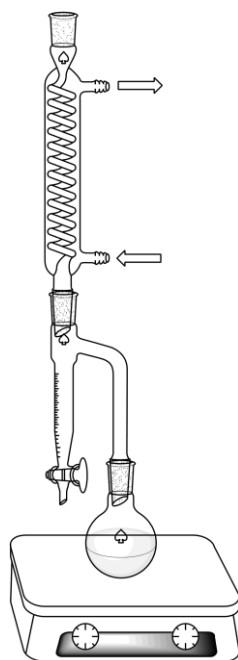
A cromatografia demonstrou a formação de dois produtos: acetato de 3-(1,3-dioxoisindolina-2-il)benzila (RF: 0,420) e 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona (RF: 0,375). Nenhum dos produtos foi corado pela ação da ninidrina. Para a separação e posterior análise de ambos os produtos, foi utilizada uma coluna cromatográfica em sílica flash.

O Produto 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona apresentou as mesmas características de fator de retenção, faixa de fusão, espectrofotometria no infravermelho e ressonância magnética nuclear do produto obtido na síntese com catálise em piridina, nos permitindo afirmar que se tratam do mesmo composto.

3 – Síntese do micofenolato de *N*-(2-hidroxietil)ftalimida

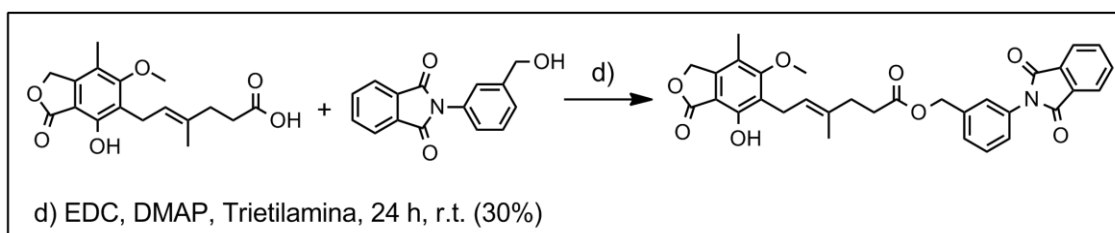


Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 0,5 g (1,56 mmol) de ácido micofenólico, 0,312 g (1,63 mmol) de *N*-(2-hidroxi-etil)ftalimida, 30 mL de tolueno anidro e ácido tolueno-4-sulfônico com catalizador. O balão foi colocado em refluxo com o aparato de Dean-Stark, conforme figura abaixo.



A mistura reacional foi mantida em agitação magnética constante a 80 °C, até total solubilização do meio. Então foi adicionado tolueno anidro no aparato de Dean-Stark até $\frac{3}{4}$ do seu volume total e a temperatura foi elevada até 150 °C. A reação foi mantida por 24 horas.

4 – Síntese do micofenolato de 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona



Em um balão de 50 mL adicionou-se 0,5 g (1,56 mmol) de ácido micofenólico, 0,243 g (1,56 mmol) de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), 0,019 g (0,156 mmol) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e 15 mL de diclorometano anidro. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética constante por 30 minutos em banho de gelo.

Após os 30 minutos a mistura reacional foi retirada do banho de gelo e adicionou-se 0,396 g (1,56 mmol) de 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolina-1,3-diona e trietilamina como catalizador. A reação foi mantida sob agitação magnética constante a temperatura ambiente por 24 horas. O monitoramento da reação foi realizado por Cromatografia de Camada Delgada, utilizando como fase móvel 50% Diclorometano e 50% Éter Etílico.

A purificação do produto obtido foi realizada em coluna cromatográfica em sílica flash, utilizando como fase móvel 50% Diclorometano e 50% Éter Etílico. Obteve-se um produto com RF de 0,85 e rendimento de 30%. O produto se decompôs a 200 °C.

De acordo,

Lucas dos Reis Ercolin

Jean Leandro dos Santos

Araraquara, __ de _____ de 2013