

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Planejamento, síntese e avaliação farmacológica
de pró-fármacos derivados do ácido micofenólico
potencialmente úteis como imunossuppressores**

Karina Pereira Barbieri

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara-SP

2018

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara

**Planejamento, síntese e avaliação farmacológica
de pró-fármacos derivados do ácido micofenólico
potencialmente úteis como imunossupressores**

Karina Pereira Barbieri

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos,
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
UNESP, para obtenção do título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

Araraquara-SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

K379p

Barbieri, Karina Pereira

Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de pró-fármacos derivados do ácido micofenólico potencialmente úteis como imunossupressores / Karina Pereira Barbieri. – Araraquara, 2018.

131 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento em Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Jean Leandro dos Santos.

1. Imunossupressores. 2. Ácido micofenólico. 3. Imunomoduladores. 4. Talidomida. 5. Pró-fármaco. I. Santos, Jean Leandro dos, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE PRÓ-FÁRMACOS DERIVADOS DO ÁCIDO MICOFENÓLICO POTENCIALMENTE ÚTEIS COMO IMUNOSSUPRESSORES

AUTORA: KARINA PEREIRA BARBIERI

ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS

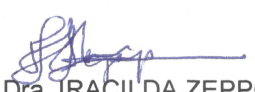
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Profa. Dra. IRACILDA ZEPPONE CARLOS
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. DIOGO RODRIGO DE MAGALHÃES MOREIRA
Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia / Instituto Gonçalo Moniz
(membro participante por vídeo- conferência)



Profa. Dra. CINTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE
Departamento de Química Orgânica / Instituto de Química do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 28 de março de 2018

AGRADECIMENTOS

Grata à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP pela oportunidade de realizar um sonho de infância, agradeço ao apoio financeiro da CAPES.

Agradeço a minha mãe que com seu jeito guerreiro sempre me ensinou a lutar pelos meus objetivos.

Agradeço aos meus guias espirituais que nunca me desamparam nos momentos mais difíceis.

Ao meu amigo Beto, que mesmo longe sempre esteve tão próximo torcendo por mim.

Ao meu amigo Felipe (Bozo) que tornou o congresso mais divertido da minha vida.

A minha grande amiga Juliana que fiz durante a pós-graduação e sempre tinha um ombro amigo e sempre permitiu que eu alugasse seus ouvidos com meus dilemas.

Aos meus colegas de laboratório Rafael, Chiba, Guilherme que sempre me ajudaram quando precisei de um auxílio nas sínteses.

Ao meu colega Gabriel que com jeito divertido sempre me apoiou.

Agradeço ao meu orientador Jean que me deu a oportunidade de trabalhar com a síntese mesmo com todas as minhas dificuldades.

Agradeço a profa. Mara que considero mais que uma professora uma amiga que sempre esteve do meu lado e sempre me ouviu, e me apresentou os livros do Saramago que ajudaram a aliviar a tensão dos meus dias.

A Marisa que se tornou mais que uma colaboradora, uma grande amiga.

À Marileide que sempre esteve comigo durante a sua pequena permanência na faculdade.

Agradeço ao meu amigo Caue que esteve sempre ao meu lado me apoiando e me apresentou os jogos do nosso Palmeiras.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
ABREVIATURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
5. RESULTADOS	47
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS	106

RESUMO

O ácido micofenólico (AM) é um fármaco imunossupressor de caráter anti-proliferativo, inibidor da enzima inosina 5-monofosfato desidrogenase (IMPDH). Apesar de ser aprovado para uso humano, apresenta como inconveniente baixa biodisponibilidade oral justificando assim otimização de sua estrutura química. Outros agentes imunossupressores incluem fármacos imunomoduladores (IMiDs) como a talidomida (TAL) e pomalidomida (POM). Estes agem inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). A pomalidomida apresenta uma atividade de inibição do TNF- α 20.000 vezes superior a talidomida, tornando-o assim, um interessante protótipo imunossupressor. A fim de otimizar os efeitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos do AM, foi proposto neste trabalho, a síntese e a avaliação farmacológica de pró-fármacos contendo A.M e as subunidades farmacofóricas presentes na TAL e POM essenciais para inibição do TNF- α . Foram sintetizados e caracterizados por métodos analíticos doze derivados ftalimídicos e também o pró-fármaco (éster). Os compostos foram avaliados com relação ao efeito citotóxico usando macrófago murino. Utilizou-se nos ensaios o método de redução do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromidiotetrazolium) (MTT) como revelador. Para o estudo de quantificação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e interleucina-1 beta (IL-1 β) e de óxido nítrico (NO) foram consideradas as concentrações de viabilidade superiores a 75%. Os compostos mais ativos identificados no ensaio de inibição de TNF- α foram: 2-(2-(hidroximetil)fenil)isoindolin-1,3-diona (intermediário V ; concentrações 12.5 – 50 μ M) e 4-amino-2-(4-(hidroximetil)fenil)isoindolin-1,3-diona (intermediário X; concentração 12.5 μ M). O intermediário X foi o único da série capaz de inibir os níveis de IL-1 β na concentração de 50 μ M. O pró-fármaco não apresentou citotoxicidade, inibiu a liberação dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 β e NO, nas concentrações testadas. As características farmacocinéticas (ADMET) *in silico* das moléculas foram obtidas para auxiliar na identificação das propriedades dos compostos para posterior estudo de transplante *in vivo*. O conjunto de dados permite inferir que o pró-fármaco é um composto promissor com efeitos inibitórios dos níveis de TNF- α , IL-1 β e NO, podendo contribuir com a regulação do sistema imune em condições de transplante e doenças autoimunes.

Palavras-chaves: Imunossupressores. Ácido micofenólico. Imunomoduladores. Talidomida. Pró-fármaco.

ABSTRACT

Mycophenolic acid (A.M.) is an immunosuppressive drug with anti-proliferative profile, known as inhibitor of the enzyme inosine 5-monophosphate dehydrogenase (IMPDH). Despite being approved for human use, it presents low oral bioavailability as major inconvenient, thus justifying optimization of its chemical structure. Other immunosuppressive agents include immunomodulatory drugs (IMiDs) such as thalidomide (TAL) and pomalidomide (POM). These drugs inhibit the production of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Pomalidomide exhibits 20,000-fold inhibition of TNF- α activity against thalidomide, making it an interesting immunosuppressive prototype. In order to optimize the pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of A.M., we have proposed in this work the synthesis and pharmacological evaluation of A.M-reciprocal prodrugs containing pharmacophoric subunits for TNF- α inhibition from TAL and POM. Twelve phthalimide derivatives were synthesized and characterized by analytical methods. Compounds were evaluated for cytotoxic effect using murine macrophage cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS) at concentrations ranging from 6.25-200 μ M. The method of reducing the 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl bromidiotetrazolium (MTT) salt as the developer was used in the tests. For the quantification study of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , interleukin 1 beta (IL-1 β) and nitric oxide, macrophage viability superior to 75% were considered. The most active compounds identified in the TNF- α inhibition assay were: 2- (2- (hydroxymethyl) phenyl) isoindolin-1,3-dione (intermediate V, concentrations 12.5-50 μ M) and 4-amino-2- 4- (hydroxymethyl) phenyl) isoindolin-1,3-dione (Intermediate X, concentration 12.5 μ M). The intermediate X was the only one of the series capable of inhibiting IL-1 β at the concentration of 50 μ M. The *in silico* pharmacokinetic profile (ADMET) of the molecules was obtained to aid in the identification of the properties of the compounds for subsequent *in vivo* transplant study. The data set allows us to infer that prodrug is an interesting prototype with inhibitory effects on IL-1 β levels, TNF- α and NO, which may contribute to the regulation of the immune system in transplantation conditions and autoimmune diseases.

Keywords: Immunosuppressants. Mycophenolic acid. Immunomodulators. Thalidomide. Prodrug.

ABREVIATURAS

AM – Ácido micofenólico

CCD – Cromatografia em camada delgada

CDCl₃-Clorofórmio deuterado

DCC – Diciclohexilcarbodiimida

DCM – Diclorometano

DMAP – Dimetilaminopiridina

DMF – N-dimetilformamida

DMSO_{d6} – Dimetilsulfóxido deuterado

GMP- Guanosina monofosfato

HLA- Antígeno de linfócitos humanos

IMiDs - imidas imunomodulatórias

IMP- Inosina monofosfato

IMPDH - Inosina 5-monofosfato desidrogenase

IL-1 β -Interleucina 1-beta

IV – Espectrofotometria na região do infravermelho

M – Molaridade

POM - Pomalidomida

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TAL – Talidomida

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

XPM- Xantina Monofosfato

Lista de Tabelas

Tabela 1. Comparação dos deslocamentos químicos para o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio da ftalimida e do intermediário I.....	p.44
Tabela 2. Comparação dos deslocamentos obtidos por espectrofotometria na região do infravermelho para ftalimida (5) e intermediário I.....	p.47
Tabela 3. Valores de rendimentos obtidos nas reações, faixa de fusão e peso molecular dos intermediários II-XII.....	p.47
Tabela 4. Comparação dos deslocamentos químicos para o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio dos intermediários II-V.....	p.50
Tabela 5. Comparação dos deslocamentos químicos para o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio dos intermediários nitro-ftalimídicos VI-IX.....	p.51
Tabela 6. Comparação dos deslocamentos químicos para o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio dos intermediários amino-ftalimídicos X-XII.....	p.52
Tabela 7. Comparação dos deslocamentos obtidos por espectrofotometria na região do infravermelho para os intermediários II-V.....	p.53
Tabela 8. Comparação dos deslocamentos obtidos por espectrofotometria na região do infravermelho para os intermediários VI-IX.....	p.54
Tabela 9. Comparação dos deslocamentos obtidos por espectrofotometria na região do infravermelho para os intermediários X-XII.....	p.55
Tabela 10. Valores de rendimentos obtidos na reação, faixa de fusão e peso molecular do pró-fármaco.....	p.56
Tabela 11. Valores dos deslocamentos químicos para o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio e de infravermelho IV do pró-fármaco.....	p.57
Tabela 12. Comparação das propriedades físico-químicas e absorção intestinal dos compostos usando o programa pkCSM.....	p.73
Tabela 13. Valores de viabilidade celular.....	137

Tabela 14. Valores de produção de TNF- α	p.138
Tabela 15. Valores de produção de IL-1 β	p.138
Tabela 16. Valores de produção de óxido nítrico (NO).....	p.139

Lista de Figuras

Figura 1. Vias de aloreconhecimento.....	p.7
Figura 2. Mecanismo de rejeição aguda de órgãos.....	p.8
Figura 3. Estrutura química do ácido micofenólico.....	p.11
Figura 4. Bioativação do micofenolato de mofetila.....	p.12
Figura 5. Via de biossíntese de purinas.....	p.15
Figura 6. Estrutura química da talidomida, destacando as subunidades ftalimidicas e glutarimidicas.....	p.17
Figura 7. Estruturas químicas das IMiDs.....	p.18
Figura 8. Efeitos pleiotrópicos dos IMiDs.....	p.20
Figura 9. Bioativação do ácido acetilsalicílico.....	p.24
Figura 10. Metabolismo do sulindaco.....	p.25
Figura 11. Reação de redução da sulfassalazina.....	p.26
Figura 12. Bioconversão do aciclovir em éster trifosfato.....	p.27
Figura 13. Planejamento do pró-fármaco derivado do ácido micofenólico.....	p.33
Figura 14. Planejamento dos derivados ftalimídicos (intermediários I – XII) a partir da estruturas dos IMiDs talidomida e pomalidomida.....	p.35
Figura 15. Rota sintética para obtenção dos derivados nitro-ftalimídicos e amino-ftalimidicos funcionalizados.....	p.37
Figura 16. Rota sintética para obtenção do pró-fármaco derivado do ácido micofenólico.....	p.38
Figura 17. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H) da ftalimida (5) (DMSO- <i>d</i> ₆ ; 300 MHz)	p.49
Figura 18. Espectrofotometria na região do infravermelho da ftalimida.....	p.50
Figura 19. Redução do MTT a formazana pela enzima redutase mitocondrial.....	p.62
Figura 20. Viabilidade celular dos intermediários I-XII, AM e POM e do pró-fármaco em diferentes concentrações.....	p. 65

Figura 21. Quantificação de TNF- α liberado de macrófagos murinos incubados com os intermediários I-XII, AM e POM e o pró-fármaco em diferentes concentrações, e estimulados com LPS.....	p.68
Figura 22. Quantificação de IL-1 β liberado de macrófagos murinos incubados com os intermediários I-XII, AM e POM e o pró-fármaco em diferentes concentrações.....	p.71
Figura 23. Quantificação de NO liberado de macrófagos murinos incubados com os intermediários I-XII, AM e POM e o pró-fármaco em diferentes concentrações.....	p.74
Figura 24. Mecanismo reacional para formação da ftalimida.....	p.78
Figura 25. Mecanismo reacional para formação do intermediário I.....	p.78
Figura 26. Mecanismo de formação dos derivados arilftalimídicos funcionalizados.....	p.80
Figura 27. Mecanismo de formação do pró-fármaco.....	p.82
Figura 28. Espectro no infravermelho do Intermediário I	p.108
Figura 29. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário I	p.109
Figura 30. Espectro no infravermelho do Intermediário II	p.111
Figura 31. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário II	p.112
Figura 32. Espectro na região do infravermelho do Intermediário III.....	p. 114
Figura 33. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário III	p.115
Figura 34. Espectro na região do infravermelho do Intermediário IV.....	p.116
Figura 35. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário IV.....	p.117
Figura 36. Espectro no infravermelho do Intermediário V.....	p.118

Figura 37. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário V	p.119
Figura 38. Espectro na região do infravermelho do Intermediário VI.....	p.120
Figura 39. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário VI.....	p.121
Figura 40. Espectro na região do infravermelho do Intermediário VII.....	p.122
Figura 41. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário VII.....	p.123
Figura 42. Espectro na região do infravermelho do Intermediário VIII.....	p.124
Figura 43. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário VIII.....	p.125
Figura 44. Espectro na região do infravermelho do Intermediário IX	p.126
Figura 45. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário IX.....	p.127
Figura 46. Espectro na região do infravermelho do Intermediário X	p.129
Figura 47. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário X.....	p.130
Figura 48. Espectro na região do infravermelho do Intermediário XI	p.132
Figura 49. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário XI	p.133
Figura 50. Espectro na região do infravermelho do Intermediário XII.....	p.135
Figura 51. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário XII.....	p.136

Figura 52. Espectro na região do infravermelho do pró-fármaco	p.138
Figura 53. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear Intermediário pró-fármaco.....	p.138

1. INTRODUÇÃO

Os fármacos imunossupressores são um grupo estrutural e funcionalmente heterogêneo de fármacos administrados concomitantemente em combinação de regimes para tratar doenças autoimunes e prevenir a rejeição de órgãos (CATTANEO, 2008).

Estes fármacos podem interferir diretamente na ativação, diferenciação ou sobrevivência das células imunes efectoras ou indiretamente no bloqueio das interações célula-célula na imunidade inata (por exemplo, macrófagos/ monócitos, células dendríticas e células *natural killer*) e nas células da imunidade adaptativa (por exemplo, linfócitos T e B) (KOVARIK, 2013).

As terapias utilizadas em doenças auto-imunes e na rejeição de transplantes incluem tratamentos que atuam em diferentes vias no sistema imune como a síntese de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , bloqueio de moléculas co-estimulatórias ou utilização de vacinação terapêutica com células T reguladoras. Uma vez que vários mecanismos efetores contribuem para a imunopatogênese das doenças auto-imunes, é provável que a interferência simultânea em vários mecanismos efetores sejam alvo eficaz no tratamento destas (FAIRWEATHER, 2007).

Os agentes imunossupressores podem ser divididos em diversas classes: biofármacos (anticorpos monoclonal e policlonal), corticóides, inibidores de calcineurina e agentes anti-proliferativos (exemplo: ácido micofenólico) (BARAN, 2002).

O ácido micofenólico (AM) apresenta propriedades anti-proliferativas e tem como principal alvo a biossíntese *de novo* das purinas. É um potente inibidor não

Introdução

competitivo da enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH) (ALLISON, 2000). A proliferação dos linfócitos B e T é inibida na presença de ácido micofenólico, pois nestas células durante a mitose há dependência da enzima IMPDH na via de novo para a biossíntese de purinas (REGUEIRA *et al.*, 2011).

Especificamente, a inibição da IMPDH leva a depleção intracelular do nucleotídeo guanosina trifosfato (GTP) (ALLISON, 2000), diminuindo a transferência de sacarídeo para glicoproteínas que são expressas em algumas moléculas de adesão importantes no recrutamento de monócitos e linfócitos para o sítio de inflamação e/ou rejeição de transplantes (HOOD, 1997).

Na clínica, o AM é utilizado principalmente na prevenção de rejeição de transplantes. Entretanto, de forma não recorrente, pode ser também usado no tratamento de várias doenças auto-imunes como lúpus eritematoso e lúpus nefrite (RAHMAN, 2013).

O AM quando administrado por via oral possui limitada absorção. Por isso, o pró-fármaco micofenolato de mofetila foi desenvolvido para melhorar a biodisponibilidade oral deste fármaco. Este pró-fármaco apresentou biodisponibilidade duas vezes superior comparada ao AM parental (NORONHA *et al.*, 1997). Resultados como estes demonstram que processos especiais de modificação molecular, especificamente a latenciação de fármacos pode o melhorar o perfil farmacocinético do AM.

Por outro lado, outros fármacos imunomoduladores (IMiDs) também podem ser explorados na terapia de doenças autoimunes e prevenção de rejeição de transplantes. Estes IMiDs podem ser divididos em primeira e segunda geração.

Introdução

Apesar dos conhecidos efeitos teratogênicos, a talidomida (TAL) pertence à primeira geração da classe dos fármacos imunomoduladores. A TAL é ainda utilizada na clínica para tratamento do eritema nodoso leproso e mieloma múltiplo. A segunda geração de imidas imunomodulatórias (IMiDs) incluem fármacos como a lenalidomida e pomalidomida, sendo que ambos apresentam maior efetividade que a talidomida no tratamento de mieloma múltiplo (ZUO, 2013).

Os IMiDs de primeira e segunda geração são capazes de inibir a liberação do fator de necrose tumor alfa (TNF- α) e outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-12) em macrófagos induzidos por lipopolissacarídeos bacterianos. Interessantemente, alguns IMiDs, principalmente os de segunda geração, têm demonstrado pronunciado efeito antitumoral (SHORTT, 2012).

A pomalidomida (POM) é um análogo da talidomida que apresenta no carbono 3 do seu anel ftalimídico a função amina primária. É um imunomodulador responsável por inibir a ativação e expansão das células T e células *natural killer* (NK), agindo também como modulador da indução de citocinas pró- e anti-inflamatória. Foi planejada e desenvolvida para o tratamento do mieloma múltiplo e mielofibrose (TERPOS *et al*, 2013). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a POM é até 20.000 vezes mais potente do que a talidomida na diminuição dos níveis de TNF- α (CHANG, 2014).

Tem sido relatado que POM realiza *up-regulation* para IL-2, IFN- γ e diminuição de IL-6. Estes efeitos contribuem para atividade anti-angiogênica e anti-mieloma da POM. Além disso, POM é também utilizada no tratamento de diversos tipos de câncer hematológico e em tumores sólidos. A ação antineoplásica se dá pela indução de apoptose de células tumorais, evidenciada

Introdução

pelo aumento do tempo da fase G1 do ciclo celular induzido pela proteína reguladora p21 (SANCTIS, 2010).

Neste trabalho, visou-se o acoplamento do ácido micofenólico e de IMIDs de primeira e segunda geração, representados pela TAL e POM, para a formação de um pró-fármaco do tipo recíproco, a fim de melhorar a biodisponibilidade do ácido micofenólico e garantir efeitos farmacodinâmicos adicionais como a inibição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β). Nossa hipótese, é que diferentemente do grupo mofetila presente no fármaco micofenolato de mofetila (que não apresenta efeito farmacológico), nos derivados planejados neste projeto o grupo ftalimida ou 3-amino-ftalimida contribuirá com o efeito imunossupressor, potencializando a ação do AM.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Transplante de Órgãos

O transplante de órgãos é uma alternativa para pacientes com falência de órgãos. O transplante envolve a implantação em um receptor, de órgãos ou tecidos de um doador. Um dos riscos deste procedimento é a presença dos aloantígenos do doador que podem acarretar uma ativação do sistema imunológico do receptor (ALLISON, 2016). Aloantígenos são proteínas que quando isoladas de um organismo de uma espécie induzem a resposta imune em outros indivíduos de mesma espécie (NEWMANN, 1997).

A divergência de proteínas imunes entre doador e receptor resulta no processo de rejeição, e leva à falência do órgão transplantado. A rejeição é uma resposta imune complexa mediada por células mononucleares, como macrófagos e células dendríticas, linfócitos B e T e mediadores inflamatórios como a citocina IL-2 (HRICIK, 2015).

A rejeição em um transplante depende do reconhecimento pelo hospedeiro do tecido enxertado como estranho. Os antígenos responsáveis por esta resposta são as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) que na espécie humana são conhecidos como antígenos leucocitários humanos (HLA) (SOUZA, 2002).

O sistema HLA, descrito por J. Dausset em 1958, são codificados por genes com 4000 kb de comprimento, localizados no braço curto do cromossomo 6. Esses genes estão dispostos em três regiões ou classes genômicas. A região mais distante corresponde ao MHC de classe I e cujas moléculas são expressas na superfície de todas as células nucleares. Os genes MHC de classe II se localizam na porção centromérica da região do MHC e a expressão destes antígenos está restrita a células apresentadoras de antígenos como macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, de Kupffer e linfócitos B. A terceira região genômica, localizada entre os outros dois genes, apresenta genes não relacionados ao MHC que codificam moléculas inflamatórias (GOLDBERG, 2014).

O reconhecimento do aloantígeno (MHC) do doador pelas células T pode se dar através das vias direta ou indireta (Figura 1). O aloreconhecimento direto e indireto representa distintos mecanismos envolvendo diferentes células apresentadoras de antígenos, células T e determinantes antigênicos. Cada via pode resultar na rejeição aguda (ADAMS, 2003).

A resposta imune adaptativa das células alogênicas inicia através do reconhecimento destes antígenos polimórficos por linfócitos T que ativa uma cascata de reações pró-inflamatórias que resultam na rejeição do órgão ou do tecido transplantado (MARINO, 2016).

Após o transplante, as células dendríticas presentes no enxerto migram para os órgãos linfóides regionais do receptor. As células T virgens localizadas nestes órgãos linfóides tornam-se ativas através do reconhecimento das moléculas de MHC expressos nas células dendríticas do doador. Este fenômeno é conhecido como aloreconhecimento direto, e promove uma resposta inflamatória que culmina na rejeição celular aguda neste órgão (MARINO, 2016).

Portanto, o aloreconhecimento direto é a interação dos peptídeos derivados de MHC alogênicos intactos apresentados por células apresentadoras de antígeno derivadas do doador e com o receptor de células T (TCR) de células T provenientes do indivíduo receptor, resultando na geração de linfócitos T citotóxicos (T CD8⁺) e células T CD4⁺ (JOELSON, 2014).

O alo-reconhecimento indireto ocorre quando peptídeos derivados do MHC do doador são degradados por mecanismos de processamento de antígenos e apresentados por células apresentadoras de antígeno do receptor (ROGERS, 2001). A Figura 1 descreve estes mecanismos, destacando-se a interação das células apresentadoras de antígenos do doador com linfócitos T, através das moléculas de MHC.

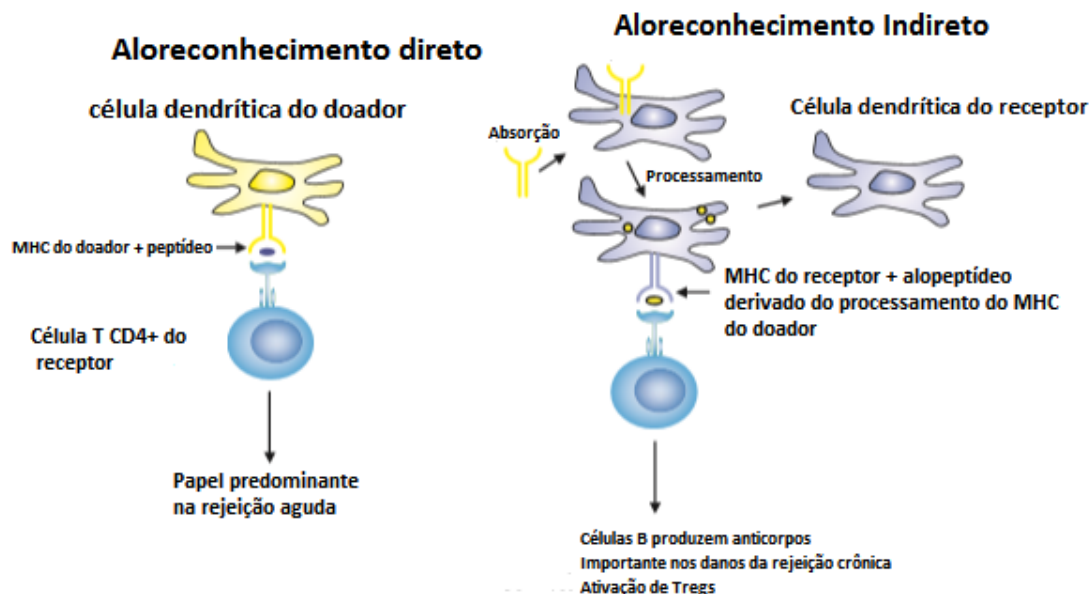


Figura 1. Vias de alorechecimento (Adaptado de Joelson, 2014).

Clinicamente, as rejeições podem ser classificadas levando em consideração o tempo de resposta pós-transplante e a característica do infiltrado celular no local da rejeição. O alvo da resposta imune pode ser preferencialmente os vasos sanguíneos e o desencadeamento desta resposta pode se dar imediatamente, agudamente (após dias e/ou meses) ou ainda tardiamente (BACAlet al,1999). A rejeição pode ser dividida em: hiperaguda, aguda e crônica.

A rejeição hiperaguda ocorre minutos a horas após revascularização do órgão com consequente ativação do complemento provocando dano endotelial e trombose, seguido da infiltração de células polimorfonucleares como neutrófilo e resultando em necrose do órgão ou tecido. A principal causa é a presença de anticorpos citotóxicos pré-formados no receptor contra antígenos do receptor, como anticorpos do sistema sanguíneo ABO, neste caso, o órgão deve ser retirado imediatamente (ABBAS, 2008).

A rejeição aguda ocorre de cinco dias a alguns meses após a realização do transplante e caracteriza-se por dano à microcirculação associada à tumefação

endotelial do órgão ou tecido transplantado. Esta é a principal forma de rejeição dos transplantes e pode ser controlada por fármacos imunossupressores. Envolve ambas as respostas imunes mediadas por células e a reação humoral (BENICHOU, 1999).

A célula T tem um papel central na rejeição aguda devido a interação com aloantígenos, predominantemente moléculas MHC, presentes na vasculatura endotelial e células parenquimais (Figura 2). Ambas as células TCD4+ e TCD8+ contribuem para a rejeição aguda. As células T CD4+ mediam a rejeição aguda por secretarem citocinas e induzir a reação de hipersensibilidade do tipo tardia. As células TCD8+ reconhecem e lisam células estranhas pela reação de aloreatividade citotóxica (LECHLER, 2005).

A Figura 2 ilustra o processo de rejeição aguda, destacando as vias de ativação do sistema imunológico e as células envolvidas.

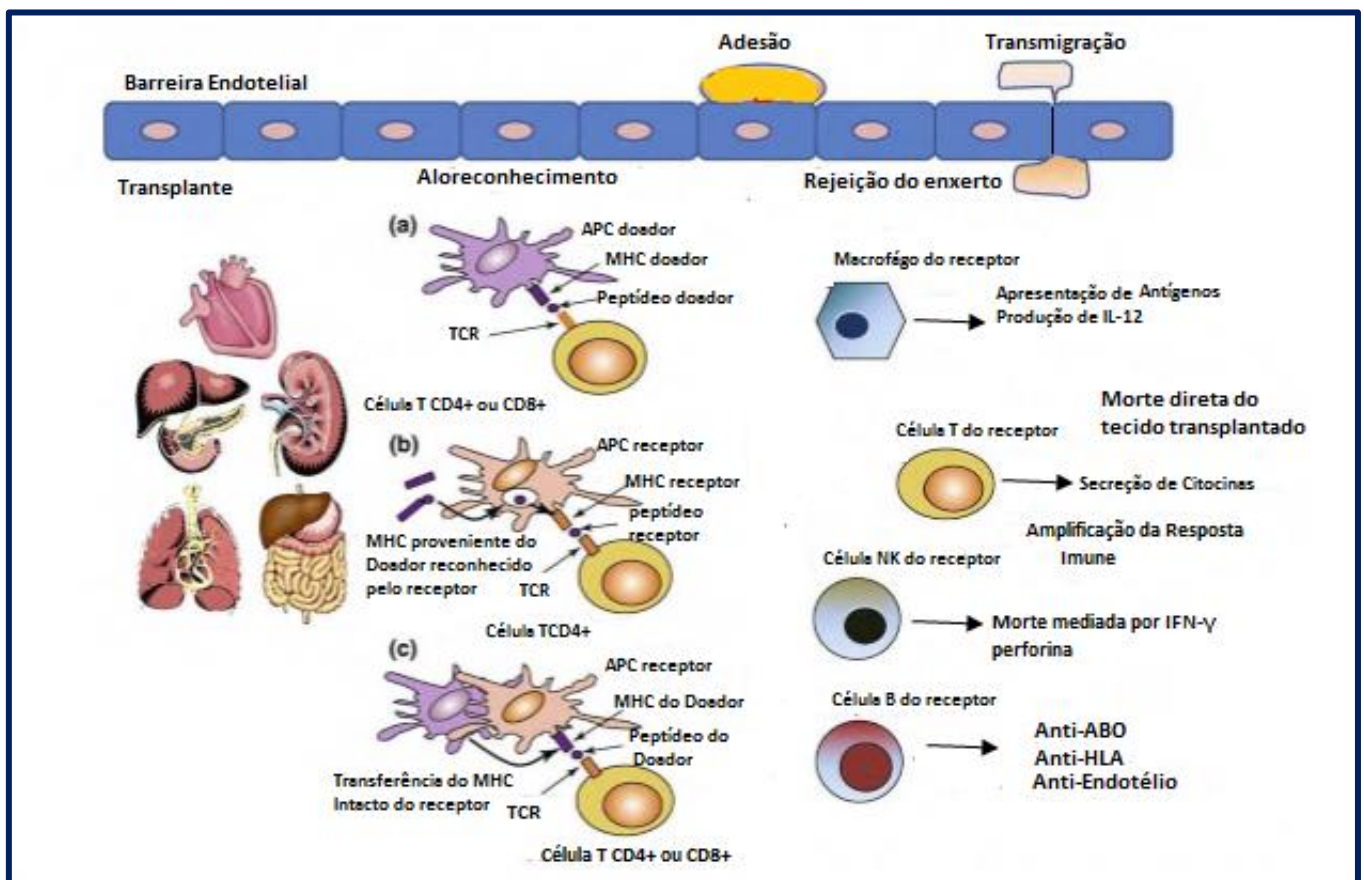


Figura 2. Mecanismo de rejeição aguda de órgãos (Adaptado de NAGARKATTI, 2010).

A rejeição de aloenxerto ocorre através de três mecanismos:

- a) Durante o reconhecimento, as células apresentadoras de antígenos (APCs) do doador apresentam os antígenos as células TCD4⁺ ou TCD8⁺ do receptor.
- b) As células APCs do receptor apresentam os antígenos do doador e ativam as células T presentes no órgãos linfoides do receptor.
- c) Alternativamente, as APCs do receptor podem adquirir moléculas intactas de MHC do doador e realizar apresentação direta às células T do organismo do receptor.

Após a apresentação do antígeno, as células T são ativadas e produzem uma grande quantidade de citocinas e quimiocinas, levando à amplificação da resposta imunológica. A quimiotaxia de diferentes células imunes no órgão enxertado ocorre via transmigração através das células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos. O reconhecimento das células do enxerto pelo sistema imune do receptor pode causar a destruição do tecido enxertado por morte direta, via ação das células NK e células TCD8⁺. As células Th1 podem ativar a reação de hipersensibilidade do tipo IV e ativar macrófagos, complementando a ativação à presença de anticorpos (NAGARKATTI et al.,2010).

A rejeição crônica representa a limitação da sobrevida do órgão transplantado, pois ocorre anos após a realização do enxerto e é a principal causa de rejeição tardia em transplantes. Caracteriza-se pela participação de linfócitos T contra antígenos de histocompatibilidade menores presentes em células hematopoiéticas. A reação imunológica provoca espessamento da parede interna dos vasos sanguíneos e oclusão da luz vascular como resultado da proliferação das células musculares. Este processo resulta em isquemia e falência do órgão (OTTO, 2004).

Muitos fatores podem aumentar o risco de incidência de rejeição crônica como: incompatibilidade HLA, lesão isquêmica, o número e severidade de episódios de rejeição aguda e infecções. A rejeição crônica não pode ser prevenida com a terapia imunossupressora disponível na clínica, portanto a

estratégia para reduzir os riscos de desenvolver este tipo de rejeição é limitar o número de episódios de rejeições agudas (LIBBY, 2001).

Imunossupressores não específicos são necessários para evitar a rejeição em transplantes de órgãos. Estes fármacos podem ser classificados de acordo com o mecanismo: 1) interrupção da divisão celular de linfócitos, 2) depleção de linfócitos, 3) interferência na maturação de linfócitos, 4) interferência com a co-estimulação de células imunes, 5) modulação da isquemia-reperfusão, 6) facilitação da indução de tolerância (DIRK, 2002).

Neste trabalho, o imunossupressor denominado ácido micofenólico foi selecionado para posterior modificação molecular visando otimizar seus efeitos terapêuticos.

2.2. Ácido Micofenólico

O ácido micofenólico (AM) (Figura 3) foi descrito pela primeira vez em 1893 por Gozio que relatou a obtenção de um composto fenólico isolado da cultura de *Penicillium glaucum* que atuava como antibiótico contra o *Bacillus anthraci*. Em 1913, Alsberg e Black descreveram vários compostos fenólicos encontrados na cultura de *Penicillium stoloniferum*, incluindo o ácido micofenólico. Entretanto, a elucidação da estrutura completa do ácido micofenólico foi realizada apenas em 1952 por Birkinshaw e colaboradores, e a síntese total foi reportada por Birch e Wright em 1969 (BIRKINSHAW, 1952 E BIRCH & WRIGHT, 1969).

O AM foi reportado com propriedades antiviral, anti-fúngico, anti-bacteriano, e antipsoríase. Começaram a ser utilizados os seus ésteres como imunossupressores em pacientes que transplantes de órgãos como o coração, os rins e o fígado e comercializado com o nome comercial de CellCept® (micofenolato de mofetila) pela Roche e Myfortic® pela Novartis (micofenolato de sódio). (REGUEIRA et al.; 2011).

O ácido micofenólico apresenta a fórmula molecular $C_{17}H_{20}O_6$ e possui o nome químico: (E)-6-(4-hidróxi-6-metóxi-7-metil-3-oxo-5-ftalanil)4-metil-4-ácido hexenóico (Figura 3).

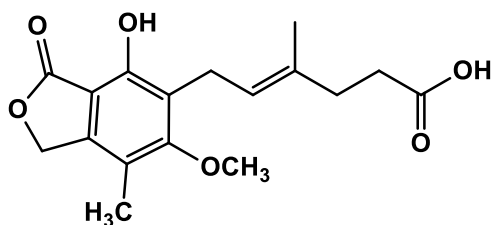


Figura 3: Estrutura química do ácido micofenólico (AM).

A estrutura química do AM inclui um anel benzeno hexassubstituído fundido com um grupo funcional lactônico. Outros grupos funcionais presentes na molécula são: hidróxi, metoxil, metil e uma cadeia lateral alquil com seis carbonos, uma ligação dupla em isomeria *E* e um grupamento carboxílico livre (CHOLEWINSKI, 2010).

O ácido micofenólico é pouco absorvido quando administrado por via oral e para melhorar esta biodisponibilidade, foi desenvolvido o pró-fármaco micofenolato de mofetila (NORONHA, 1997).

O micofenolato de mofetila (MMF), também denominado éster 2-morfolinoetil do ácido micofenólico, apresenta biodisponibilidade oral de 94,1% em voluntários sadios. Depois de absorvido, o MMF é rapidamente convertido por esterases no plasma, fígado e rins em ácido micofenólico. O AM é inativado no fígado via efeito de primeira passagem, sofrendo glucuronização. Uma parte significativa do glucuroneto fenólico resultante é secretada na bile e reciclado para o fígado através da recirculação entero-hepática. O micofenolato glucuronizado é incapaz de penetrar a parede celular e é, portanto inativa; porém pode ser convertida em AM pela enzima β -glucuronidase. Esta enzima é encontrada em altos níveis na epiderme e no trato gastrointestinal (ZWERNER; FIORENTINO, 2007).

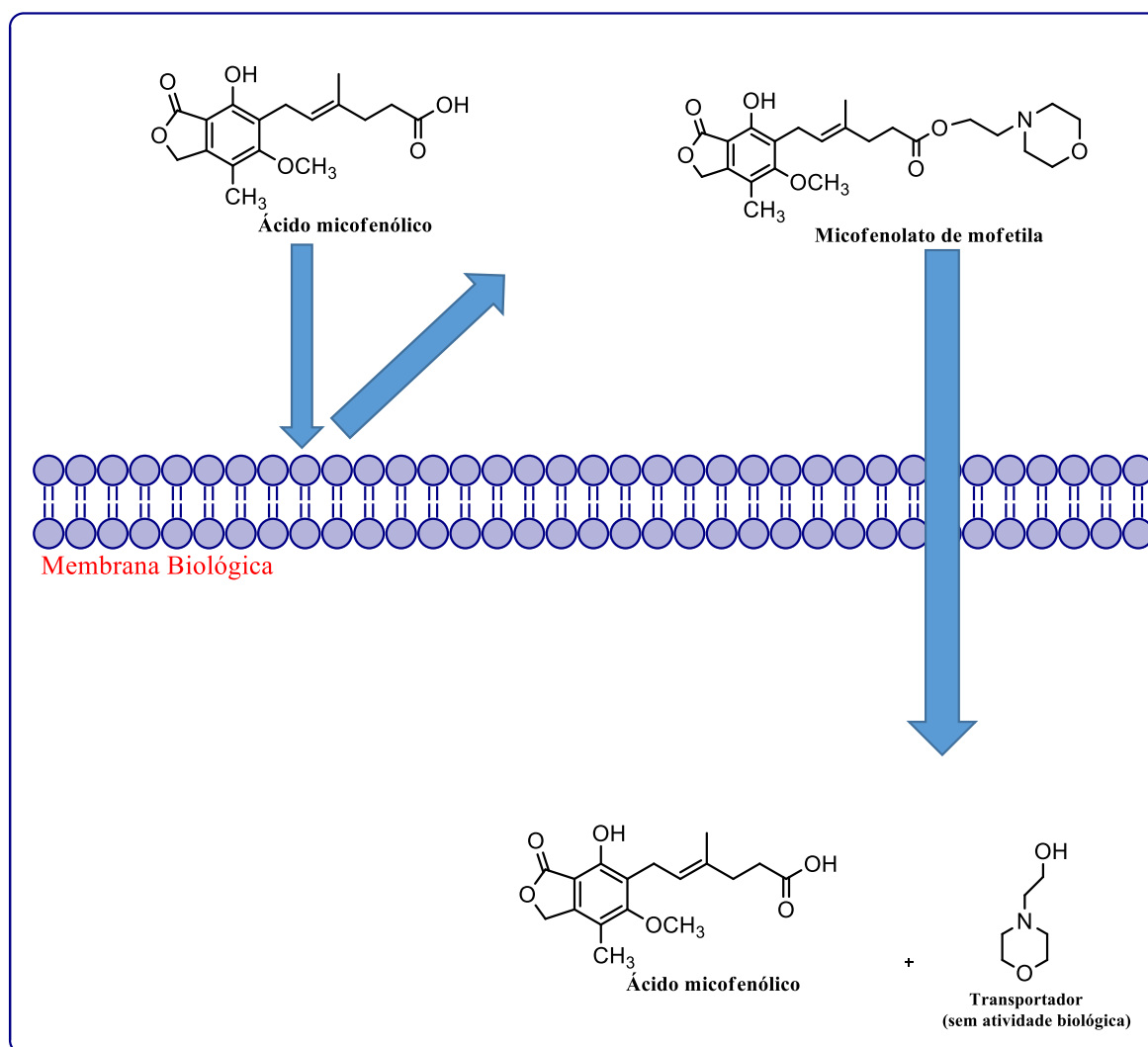


Figura 4: Bioativação do micofenolato de mofetila

O MMF apresenta-se como uma alternativa a outros imunossupressores pela sua reduzida toxicidade. Apresenta como efeitos colaterais: problemas gastrintestinais e hematológicos que normalmente desaparecem com a redução da dose, sendo portanto, totalmente reversíveis (KIM, 2012).

O MMF foi aprovado pelo FDA como profilático de rejeição de órgãos depois de um transplante renal em 1995. A posologia recomendada para esta indicação é de 1g duas vezes ao dia. Em transplantes cardíacos previne a rejeição com uma posologia de 1,5 g duas vezes ao dia por via oral, em combinação com outros imunossupressores como a ciclosporina e corticóides. Em 2000, o

micofenolato de mofetila foi aprovado para profilaxia de rejeição aguda após o transplante de hepático, a dose recomendada neste caso é de 1 g duas vezes ao dia intravenoso ou 1,5 g duas vezes ao dia via oral (VILLARROEL, 2009).

As outras indicações do MMF são para o transplante de pulmão, pâncreas e no tratamento de doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrites e em doenças dermatológicas como psoríase (JONES, 1975).

O AM exerce o seu efeito imunossupressor através da inibição da síntese de novo de purinas, o que provoca a indução da apoptose da linhagem celular de linfócitos T. Na presença do AM ocorre acúmulo das células T na fase S da divisão celular, tornando esta linhagem celular susceptível a apoptose (ALLISON, 2000). No trabalho de Allison e colaboradores de 1977 foi demonstrado que os linfócitos são dependentes da via da biossíntese *de novo* de nucleotídeos (ALLISON, 1977).

O mecanismo de ação do AM é baseado na inibição específica não competitiva da enzima inosina 5-monofosfato desidrogenase (IMPDH). Esta enzima está envolvida na biossíntese de nucleotídeos para a proliferação, diferenciação e morte celular. Em geral, existem duas vias de biossíntese de nucleotídeos - a via *de novo* (quando o anel purina ou pirimidina serão sintetizados) e a via de salvamento (quando as núcleo-bases são recicladas). A atuação sobre a biossíntese *de novo* bloqueia a produção de precursores da síntese de RNA e DNA. Esta reação é dependente de NAD⁺ e envolve a conversão de inosina-5' monofosfato (IMP) à xantina-5'-monofosfato (XPM) (CHOLEWINSKI, 2010).

A IMPDH catalisa a etapa limitante da conversão de inosina monofosfato (IMP) à guanosina monofosfato (GMP) na biossíntese de novo de purinas. A

Revisão Bibliográfica

IMPDH liga o cofator NAD^+ no sítio ativo da IMP, que atua como acceptor de hidrogênio e a partir de IMP se forma a xantina monofosfato (XMP) e subsequentemente converte GMP em guanosina trifosfato (GTP) e deoxiguanosina trifosfato (dGTP) (Figura 4). A IMP pode catalisar a conversão de GMP ou adenosina monofosfato (AMP) e a regulação desta síntese depende do balanço da produção dos nucleotídeos adenosina e guanosina (SINTCHAK, 2000).

Via da Biossíntese de Purinas

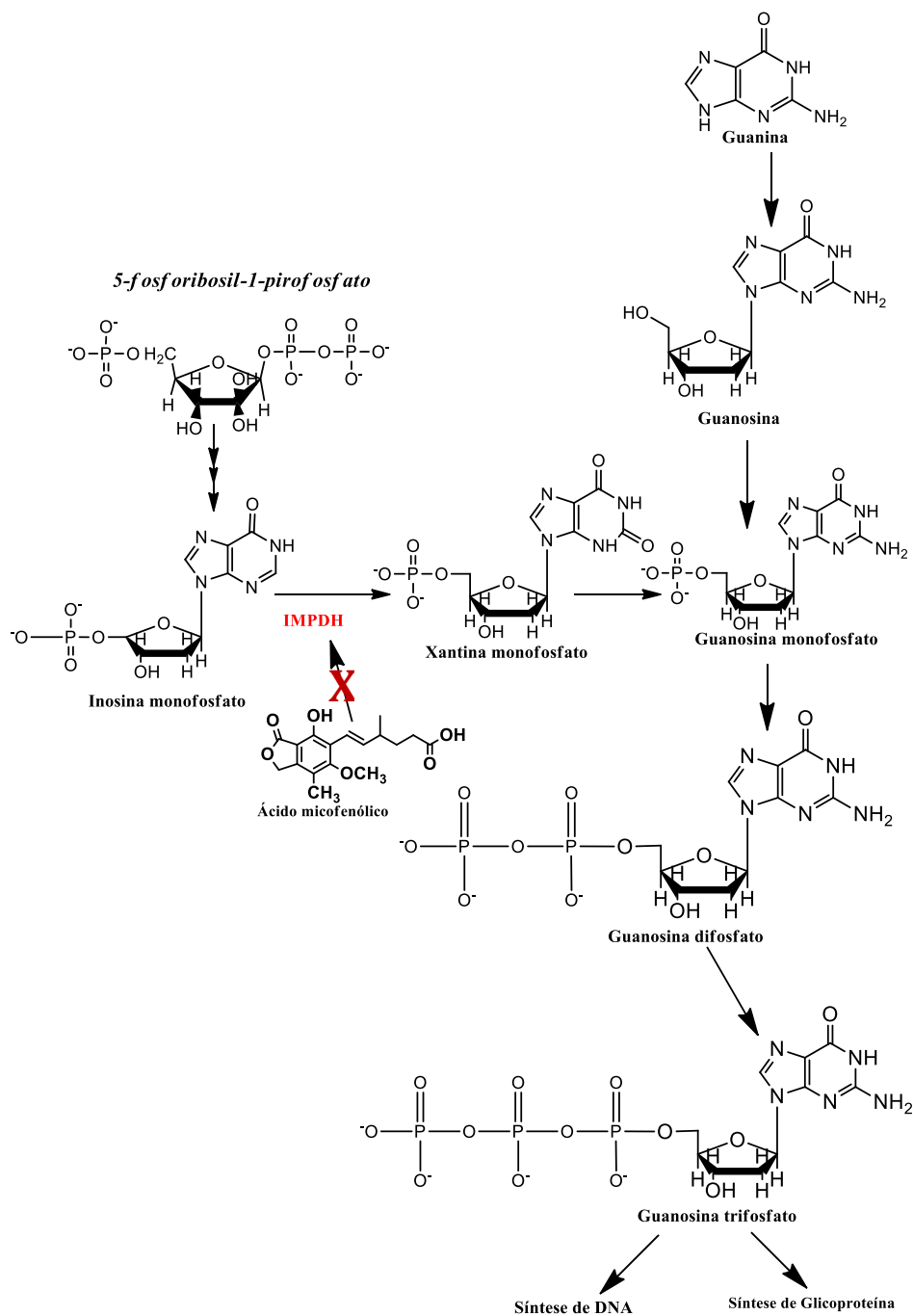


Figura 5. Via de biossíntese de purinas (Adaptado de SINTCHAK, 2000).

A inibição da IMPDH depleta os estoques dos nucleotídeos guanósina, e isto resulta no excesso relativo dos nucleotídeos adenosina difosfato (ADP) e AMP

suprimindo a síntese de DNA através da depleção da dGTP, que é a última etapa antes da produção de DNA (ALMQUIST, 1998).

Os tipos celulares em que predominam a via *de novo* da biossíntese de purina são significativamente mais afetados pela ação do AM. Por isso, ocorre inibição da proliferação de linfócitos T e B, inibindo a formação de anticorpos e a geração de células T citotóxicas (SOLLINGER, 1995).

A enzima IMPDH foi descrita em procariontes e eucariontes e apresenta 36% de homologia entre a enzima de *E.coli* e as proteínas humanas. Muitas espécies têm dois genes para a enzima, tipo I e tipo II. Em humanos cada gene codifica uma proteína com 514 aminoácidos e elevada homologia entre as isoformas, 84% de identidade entre as sequências de aminoácidos. A enzima ativa é formada por um tetrâmero constituído por subunidades idênticas com 55kDa de peso molecular (CARR, 1993).

Várias estruturas catalíticas proporcionam uma base para modelos de relação estrutura-atividade das isoenzimas IMPDH I e II. Cada monômero consiste de dois domínios estruturalmente semelhantes, um domínio catalítico central e um subdomínio. O domínio catalítico constituído de aproximadamente de 400 aminoácidos em uma dobra de oito filamentos em $\alpha\beta$ -barril. Uma fenda no barril, próxima da interface entre os dois monômeros forma o sítio ativo, locais de ligação do IMP e do NAD⁺. O subdomínio da enzima constitui cerca de 120 resíduos de aminoácidos (GELDER, 2015).

O AM atua sobre as duas isoformas da enzima: IMPDH I (expressa em células normais) e IMPDH II (presente em altos níveis em células neoplásicas). A IMPDH I é constitutivamente expressa e grande parte da isoforma é encontrada

em linfócitos normais, por outro lado a IMPDH II é uma isoforma induzível e está ligada a diferenciação e transformação de células neoplásicas. A IMPDH II é o tipo mais abundante em linfócitos ativos e é cinco vezes mais susceptível ao AM do que a isoforma IMPDH I (FRYMOYER, 2012).

As duas isoenzimas da IMPDH apresentam mecanismos catalíticos comuns e atividades indistinguíveis. A atividade catalítica envolve a reação de desidrogenase e uma reação de hidrólise que são acompanhadas com mudança de conformação. IMPDH se liga a IMP no seu sítio ativo e a reação é iniciada por um ataque nucleofílico de uma cisteína na posição Cys 331 na posição C2 da IMP para formar um intermediário (VILLAROEL, 2009).

2.3. Talidomida e as imidas imunomoduladoras (IMiDs)

Em 1956, a talidomida (TAL) (Figura 5) foi comercializada como Conteragan® pela empresa alemã Chemie-Grünenthal como sedativo não barbitúrico. Além do efeito hipnótico, a talidomida apresentou efeito anti-emético, e foi usado para tratamento de enjoos matinais em grávidas. (VARGESSON, 2013).

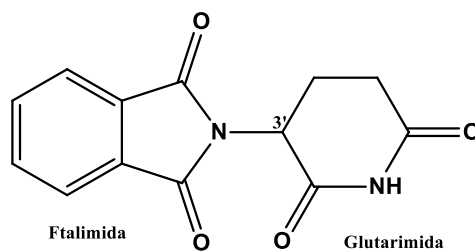


Figura 6. Estrutura química da talidomida, destacando as subunidades ftalimidicas e glutarimidicas.

Porém em 1961 associou-se o uso da talidomida ao nascimento de crianças com severos defeitos congênitos devido ao uso do fármaco durante o

primeiro trimestre de gestação. Aproximadamente 10.000 crianças nasceram com malformações dos membros superiores (focomelia) e outras deficiências, nesta época (LENZ, 1962).

Os principais defeitos congênitos em fetos associados a uso de talidomida durante a gravidez, foram: focomelia (ausência ou hipoplasia dos membros superiores), ausência de membros, defeitos no fêmur e tíbia, assim como malformações no coração. Anormalidades do trato intestinal, urinário e defeitos em outros órgãos internos também foram relatados (MCBRIDE, 1961).

Devido a este incidente o fármaco foi abolido mercado farmacêutico mundial, porém na década de 90 descobriu-se os seus efeitos imunomoduladores (DIGGLE, 2001). A partir deste momento o interesse para talidomida foi revisto, demonstrou-se sua efetividade em diversas doenças como eritema nodoso leproso e mieloma múltiplo (CALABRESE, 2000).

A talidomida é um derivado do ácido glutâmico e em sua estrutura apresenta dois anéis: anel ftalimídico e um anel glutarimídico com um carbono assimétrico. A molécula da talidomida apresenta atividade opticamente ativa e duas formas isoméricas S e R, sendo que clinicamente é utilizada a mistura racêmica. Há evidências que a talidomida em humanos interconverte-se entre suas formas isoméricas em condições fisiológicas (TIAN, 2012).

As propriedades químicas da talidomida são: insolubilidade em éter e benzeno, ligeiramente solúvel em água, metanol, etanol, acetona e ácido acético glacial, totalmente solúvel em dioxano, dimetil formamida, piridina e clorofórmio. As ligações amidas da estrutura são susceptíveis a clivagem hidrolítica *in vitro* e *in vivo* em pH maior do que 6,5 (TSENG et al, 1996).

Estudos de relação entre a estrutura química e a atividade biológica demonstraram que a presença do núcleo ftalimídico é essencial para atividade farmacológica na inibição da citocina TNF- α . As funções anti-inflamatórias e anti-angiogênicas da talidomida são, portanto, controladas pela transcrição do NF-kB e liberação de TNF- α . A talidomida diminui a produção de TNF- α em macrófagos e monócitos por inibir a produção de RNA mensageiro responsável pela tradução do TNF- α (MATTHEWS, 2003). Estudos de relação estrutura-atividade mostram ainda a irrelevância do núcleo glutarimídico, detentor do centro assimétrico na molécula da talidomida sobre a ação imunomoduladora (JOGLEKAR, 2004).

A talidomida e seus análogos são conhecidos como imidas imunomoduladores (IMiDs), devido aos diferentes efeitos nas células imunes (LINDNER, 2016).

A talidomida pertence à primeira geração da classe de IMiDs, enquanto que a segunda geração de IMiDs inclui a lenalidomida e a pomalidomida, sendo que ambos demonstram maior potência anti-mieloma múltiplo, anti-inflamatório e atividade imunomodulatória do que a talidomida (ZHU, 2013).

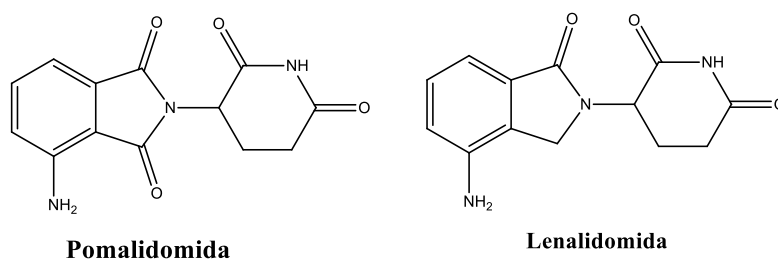


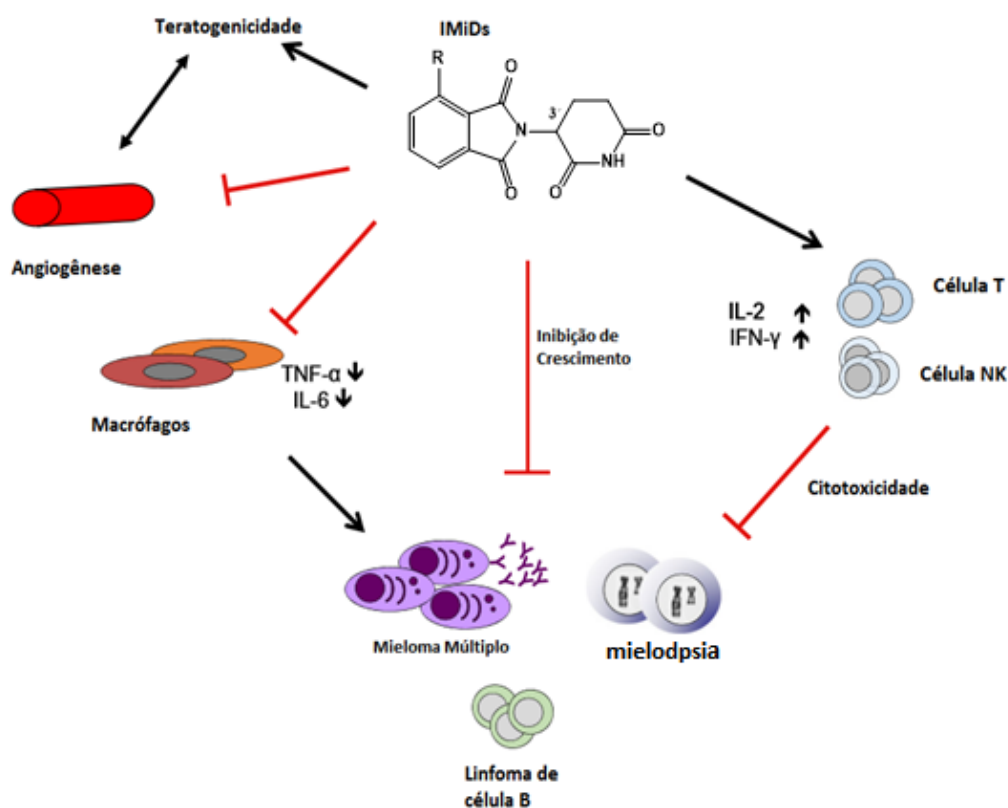
Figura 7: Estruturas químicas das IMiDs (pomalidomida e lenalidomida)

Os derivados mais potentes da talidomida, a lenalidomida e a pomalidomida (Figura 7) foram sintetizados pela adição de um grupamento amino na posição 3 do anel ftalimidico e a remoção de um grupo carbonílico na lenalidomida. Estas

modificações resultaram no aumento da inibição de citocinas e na atividade anti-mieloma da lenalidomida e da pomalidomida, que foram aprovados para o tratamento de mieloma múltiplo (SCHEY et al, 2004).

Os IMiDs apresentam ação através de múltiplos mecanismos, influenciando a angiogênese e a produção de citocinas, assim como os efeitos de co-estimulação nas células T e o efeito citotóxico direto (SCHAFFER et al, 2003).

Estes fármacos apresentam inúmeras propriedades pleiotrópicas (Figura 6) incluindo a imunomodulação, atividade anti-angiogênica, atividade anti-inflamatória e efeitos anti-proliferativos (QUACH et al, 2009).



R = NH_2 (pomalidomida); R = H (talidomida)

Figura 8. Efeitos pleiotrópicos das IMiDs (Adaptado de Linder de 2016).

As propriedades anti-inflamatórias incluem a inibição da proteína- α inflamatória de macrófagos e diminuição da produção de TNF- α a partir de monócitos estimulados por LPS. Comparados com a talidomida, a inibição de TNF α foi 2000 vezes mais potente com lenalidomida e 20000 vezes mais potente com pomalidomida (MULLER et al, 1999).

Estudos *in vivo* mostraram que os IMiDs aumentam a atividade do sistema imune adaptativo, além da ativação do sistema imune inato através da co-estimulação de células T e aumento de células NK (*Natural Killer*) (DAVIES et al, 2001).

Os efeitos anti-angiogênicos são mediados pelos seus metabólitos hidroxilados, cuja formação é específica em humanos, cujo o mecanismo de ação neste caso ocorre através da inibição da ação de fatores quimiotáticos envolvidos na migração de células endoteliais incluindo TNF- α , VEGF e β FGF (DREDGE et al, 2002).

2.4. Pró-fármacos

Pró-fármacos são fármacos inativos, quimicamente modificados e, na maior parte das vezes, ligados covalentemente a um transportador através de uma ligação lábil. Esta ligação pode ser quebrada por um processo enzimático ou não enzimático no organismo, liberando assim o fármaco que vai desempenhar o efeito terapêutico desejado. Quando há transportador, este deve possuir algumas características que incluem: a) grupos químicos que permitam a interação com o fármaco; b) ausência de efeitos tóxicos; c) atividade farmacológica (ex. pró-fármacos recíprocos) ou não (ex. pró-fármacos clássicos); d) deve ser excretado

do organismo sem causar nenhum dano ou efeito colateral (KARPAGAVALLI, 2016). O processo de obtenção dos pró-fármacos é chamado de latenciação (WERMUTH, 2006).

Estima-se que aproximadamente 10% dos fármacos que são comercializados no mundo podem ser classificados como pró-fármacos. Em 2008, um em cada três de todas as moléculas de pequena massa molecular aprovadas no mundo foram pró-fármacos (HUTTUNEN, 2011).

O pró-fármaco pode ser utilizado para melhorar as propriedades farmacocinéticas como: absorção, distribuição, metabolização e excreção (ADME) (MILES, 2009). Esta estratégia pode ser usada para aumentar a seletividade do fármaco no seu local de ação. Além de melhorar a eficácia do fármaco pode diminuir o risco de toxicidade sistêmico (RAUTIO, 2008).

Durante o planejamento do pró-fármaco as propriedades físico-químicas do fármaco matriz podem ser modificadas. Um exemplo é a solubilidade em água, que pode ser aumentada ou diminuída. Por exemplo, a baixa solubilidade é uma limitação ao uso terapêutico de numerosos fármacos uma vez que para o processo de absorção a etapa de solubilização nos fluidos aquosos é essencial. Por outro lado, aumentar a lipofilicidade de fármacos solúveis em água, pode aumentar a permeabilidade destes através do processo de difusão passiva entre as membranas (DAHAN, 2014). Alternativas para modificar a solubilidade através da estratégia de obtenção de pró-fármacos é amplamente descrito na literatura (FASINU, 2011; JORNADA et al., 2015). Na terapêutica o metabolismo pré-sistêmico no trato gastrointestinal e no fígado pode reduzir consideravelmente a quantidade de fármaco ativo presente na circulação sanguínea e que atinge o alvo

de ação. A estrutura do pró-fármaco pode proteger o fármaco deste rápido metabolismo, utilizando-se um transportador que se liga a estrutura do fármaco, mas que seja metabolicamente lábil (PERSSON et al., 1995)

Os pró-fármacos podem ser sintetizados também com propósito de facilitar o transporte seletivo de fármacos para diferentes sistemas no organismo. Um exemplo, é o sistema nervoso central, que por conta da barreira hematoencefálica pode ser pouco alcançado por fármacos com caráter mais hidrossolúvel. Três estratégias básicas podem ser utilizadas para facilitar o transporte de fármacos para o sistema nervoso central: 1) aumento do transporte passivo mascarando grupos polares, 2) diminuição do efluxo de fármacos do cérebro para o sangue, 3) uso de transportadores que facilitam a movimentação das moléculas através da barreira hematoencefálica, permitindo atingir o SNC (PARDRIDGE, 2007).

As principais vantagens da síntese de pró-fármacos são: a redução dos efeitos adversos do fármaco padrão, o fármaco pode ser direcionado para o sítio específico, efeitos sinérgicos podem ser obtidos sem a presença de efeitos colaterais, adição de atividade farmacológica além da ação do fármaco padrão. Entretanto, as principais limitações para o desenvolvimento dos pró-fármacos podem estar ligados à produção de metabólito tóxico durante a biotransformação (NASA, 2014).

Os pró-fármacos podem ser classificados em: pró-fármacos clássicos, bioprecursores, pró-fármacos recíprocos ou mútuos, fármacos dirigidos e mistos (PARISE-FILHO, 2010).

Pró-fármacos clássicos: são obtidos a partir da ligação química de do fármaco e um grupo transportador através de uma ligação química hidrolisável.

Este pró-fármaco melhora as propriedades físico-químicas e consequentemente a eficácia terapêutica do fármaco padrão, com redução da toxicidade, ação prolongada e aumento na biodisponibilidade. Normalmente estes pró-fármacos são inativos e necessitam sofrer uma hidrólise química ou enzimática, para assim liberar o fragmento ativo (BEAUMONT, et al, 2003).

A aspirina apresenta uma de suas indicações como anti-inflamatório exemplifica um pró-fármaco clássico que sofre a ação das hidrolases para liberar o ácido salicílico e o acetato. O íon acetato causa inibição irreversível da ciclooxigenase (COX) por uma ligação ao resíduo de serina no sítio ativo da enzima COX e resultando na supressão de prostaglandinas como demonstrado na Figura 9, a inibição das prostaglandinas podem resultar em úlceras gástricas, insuficiência renal e inibição da agregação plaquetária (PEESA et al., 2016).

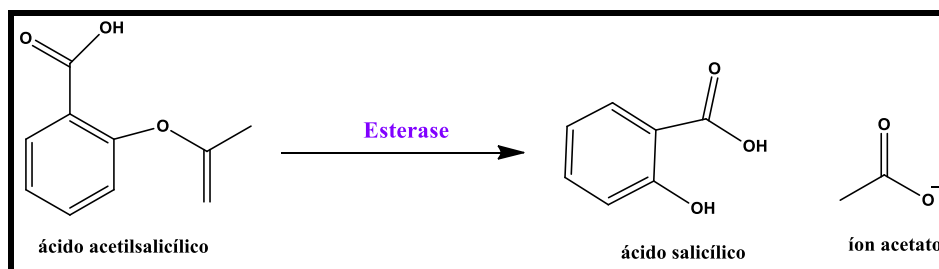


Figura 9: Bioativação do ácido acetilsalicílico

Bioprecusores: são formas latentes que requerem biotransformação, geralmente por mecanismos de oxi-redução, para liberar o composto ativo. Neste tipo de pró-fármaco não há transportadores (ETTMAYER et al., 2004).

O sulindaco é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) e tem como característica ser um pró-fármaco bioprecursor. Na Figura 10 observa-se o metabolismo sofrido pelo sulindaco por enzimas hepáticas em um metabólito sulfônico e um sulfeto através de uma reação de redução (DAVIES, 1996).

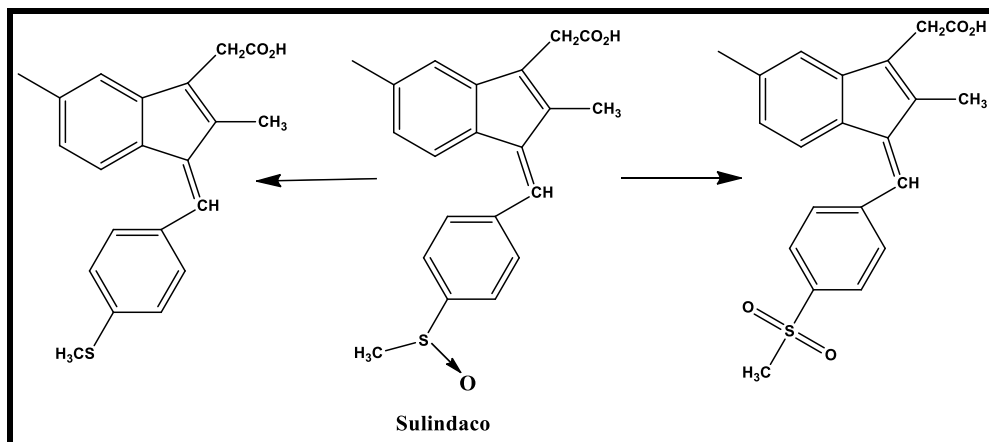


Figura 10: metabolismo do sulindaco

O sulindaco é considerado menos irritante para a mucosa gástrica do que os outros anti-inflamatórios não esteroidais. O pró-fármaco pode reduzir o risco de danos intestinais comparados uso convencional de fármacos

Pró-Fármacos recíprocos ou mútuos: derivados a partir da associação química entre dois fármacos, um fármaco atua no transporte do outro, melhorando assim o efeito de ambos. Resultando em um efeito sinérgico de ambos os fármacos (CHUNG, 2005).

A sulfassalazina (Figura 11) é um exemplo de pró-fármaco mútuo, em que há a ligação entre o 5-ácido aminosalicílico (5-ASA) e a sulfapiridina, indicado para o tratamento de colite ulcerativa (SHARMA et al, 2004).

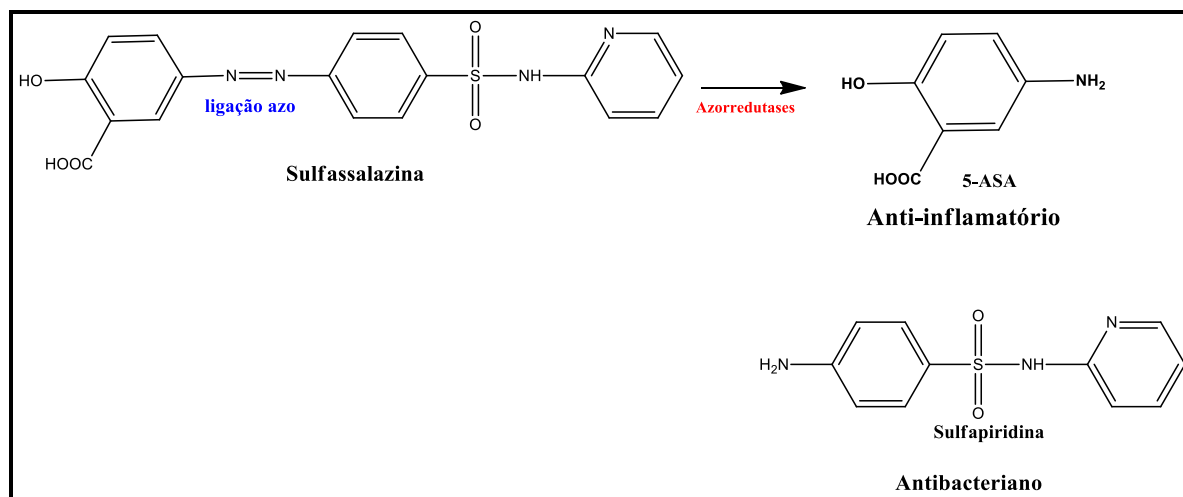


Figura 11: Reação de redução da sulfassalazina

A 5-ASA e a sulfapiridina estão ligadas através de uma ligação azo, que é reduzida por enzimas azorredutases secretadas pela microflora intestinal. O fragmento 5-ASA tem ação anti-inflamatória no cólon. A vantagem dessa abordagem é que a clivagem da ligação azo e a geração de 5-ASA antes da absorção impede sua absorção sistêmica e ajuda a concentrar-se no sítio ativo. A sulfapiridina foi selecionada como transportador neste pró-fármaco, devido à sua atividade antibacteriana (BHOSLE, 2006).

Fármacos dirigidos: os transportes apresentam a capacidade de transportar seletivamente os fármacos do local de administração até o sítio de ação. Neste tipo de fármaco devido a especificidade de receptores as reações adversas são reduzidas, ocorrendo a redução da toxicidade do fármaco (CHUNG, 1999).

O aciclovir é um exemplo de pró-fármaco desta classe, o aciclovir é convertido em seu éster monofosfato pela enzima timidina quinase que é codificada pelo herpesvírus. Após as enzimas celulares do hospedeiro catalisam a conversão de monofosfato em trifosfato, farmacologicamente ativo. Esta conversão em éster trifosfato é significativamente maior em células infectadas, esta ativação específica

do aciclovir o torna um fármaco com elevada eficácia terapêutica e baixa toxicidade contra células não infectadas (KEARNEY, 1996).

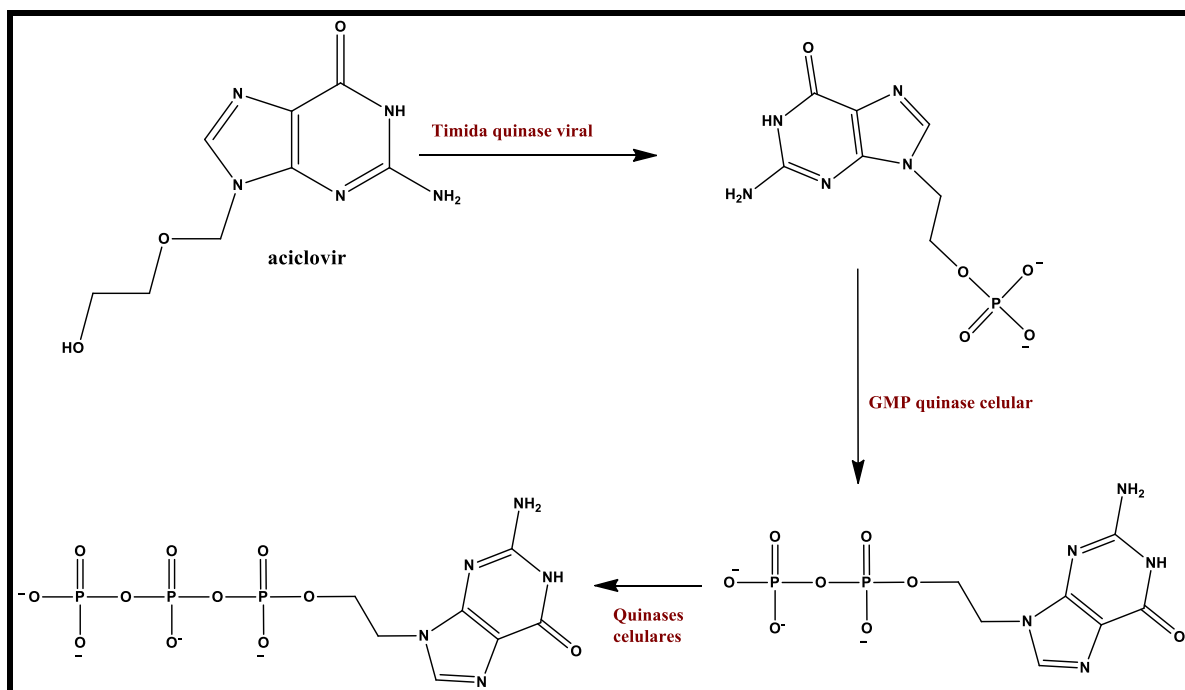


Figura 12: Bioconversão do aciclovir em éster trifosfato, farmacologicamente ativo.

Pró-fármacos mistos: Esta classificação se refere a pró-fármacos que contém como subunidade o fármaco e um transportador, após a reação de quebra da ligação, o fármaco encontra-se inativo. Havendo necessidade de outra reação para a ativação do fármaco (CHUNG, 2005).

Nesta pesquisa, esta estratégia de modificação molecular foi utilizada visando modular inconvenientes farmacocinéticos do fármaco matriz – ácido micofenólico. Especificamente, essa estratégia se justifica devido ao sucesso na obtenção do pró-fármacos micofenolato de mofetila, disponível na terapia.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho visa a síntese e avaliação farmacológica de novos compostos imunossupressores que possam ser úteis como imunossupressores.

Objetivos específicos

1. Síntese e caracterização de ftalimidas derivadas da talidomida e pomalidomida.
2. Síntese, caracterização e avaliação farmacológica do pró-fármaco de ácido micofenólico.
3. Avaliação *in silico* das propriedades farmacocinéticas dos derivados ftalimídicos e pró-fármaco.
4. Determinação da citotoxicidade dos derivados ftalimídicos sintetizados usando macrófagos murinos.
5. Avaliação da capacidade dos compostos em inibir as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) e óxido nítrico (NO) produzidos por macrófagos murinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes e solventes

- 3-(aminofenil)metanol (Sigma Aldrich);
- 4-(aminofenil)metanol (Sigma Aldrich);
- 2-(2-hidroxietil)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (Sigma Aldrich);
- N-2-hidroxietil-ftalimida (Sigma Aldrich);
- 2-(4-aminofenil)etanol (Sigma Aldrich);
- acetato de etila P.A (Synth);
- ácido acético glacial P.A. (Merck);
- ácido clorídrico P.A. (Merck) ;
- ácido nítrico P.A. (Merck) ;
- anidrido acético P.A. (Across);
- anidrido ftálico (J.T. Baker);
- cloreto de potássio (Synth);
- diclorometano P.A. (Synth);
- formaldeído P.A. (Merck);
- fosfato de potássio (Synth);
- hidróxido de sódio (Vetec);
- piridina (Sigma Aldrich);
- uréia (Merck);

4.2. Equipamentos

- Espectrômetro Bruker, modelo DRX-300 (300MHz);
- Espectrofotômetro Shimadzu de leitura na região do infravermelho FTIR-8300;
- Espectrofotômetro UV/Vis Shimadzu;
- Aparelho de ponto de fusão capilar modelo SMP3 da Bibby Stuart Scientific;
- Cromatógrafo preparativo IsoleraTM Spektra System, 1 canal, detector UV-Vis (200-800 nm).
- Leitor de microplacas Labsystem Multiskan Ascent
- Lavadora de microplacas Biotek ELX 50
- Microscópio Nikon Eclipse E100
- Câmara de Neubauer
- Capela de Fluxo Laminar Veco
- Centrífuga Universal32R.
- Kits de Elisa BD Biosciences: TNF- α e IL-1 β

4.3. Animais

Foram utilizados camundongos machos da espécie *Mus musculus* e linhagem Swiss (25-30g), com 6-8 semanas de idade provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB/UNICAMP. Os animais foram transferidos e mantidos no biotério do Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCFar UNESP em condições controladas de

temperatura, umidade e luz (escuro/luz 12/12h) e com ração balanceada e água *ad libitum*. Todos os animais usados neste trabalho foram manipulados de acordo com a normas estabelecidas pela Comissão de Ética Internacional para manuseio de animais em modelos de experimentação. A execução dos experimentos foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas sob o protocolo CEUA/FCF/CAr: 08/2017 (ANEXO I).

4.4. MÉTODOS

4.4.1. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

A identificação do protótipo é a etapa-chave para a descoberta da arquitetura molecular adequada para ação dos candidatos a fármacos. Entretanto, para assegurar o perfil farmacodinâmico, e principalmente farmacocinético adequado para um fármaco a otimização é ferramenta imprescindível para obtenção de compostos mais ativos e com maior segurança para utilização em humanos.

Nesta pesquisa, o planejamento estrutural foi realizado em duas etapas. Inicialmente foram sintetizados 12 derivados da talidomida ou pomalidomida (Figura 7). Para ambos os fármacos, os efeitos imuno-moduladores são decorrentes em parte da inibição da expressão do RNAm de TNF- α (RIBEIRO *et al.*, 2000). Estudos de relação entre a estrutura química e a atividade biológica demonstraram que a subunidade ftalimídica (Figura 7) é o grupo farmacofórico primário para modulação da biossíntese de TNF- α (LIMA *et al.*, 2001).

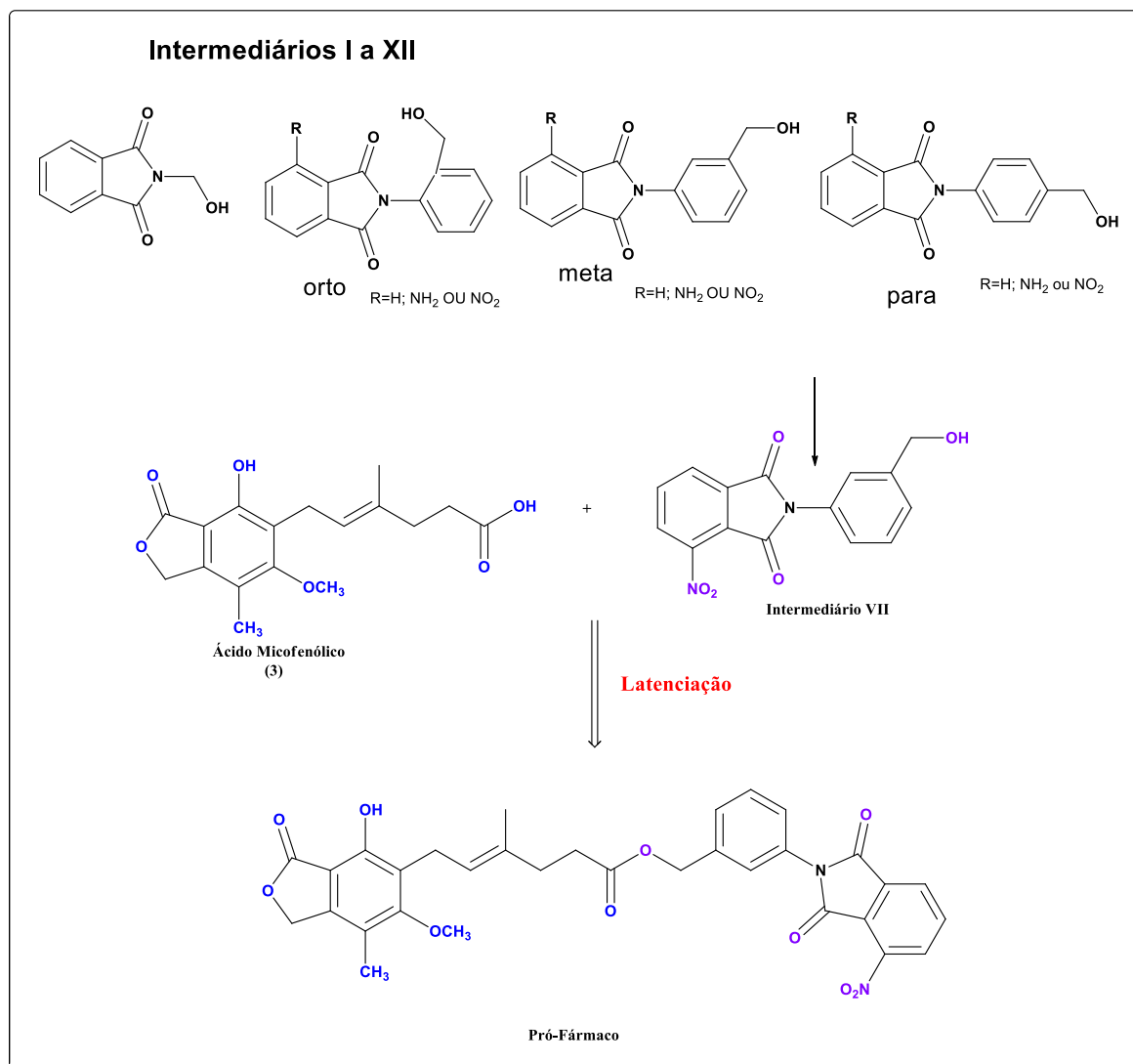


Figura 13: Planejamento estrutural da síntese do pró-fármaco a partir dos intermediários ftalimídicos e do ácido micofenólico.

Já o grupo glutarimídico não contribui para o efeito de redução dos níveis de TNF- α . Além disso, esta subunidade contém o centro estereogênico, e sua eliminação pode diminuir os efeitos teratogênicos causados pela TAL e POM. Para a talidomida, sabe-se por exemplo, que a atividade teratogênica é dada pelo enantiômero S. Estudos recentes, tem demonstrado que o mecanismo molecular do efeito teratogênico esta diretamente relacionado à subunidade glutarimídica, após esta se ligar e inibir o cereblon (CRBN). O CRBN é uma proteína humana

Material e Métodos

cujo gene se encontra no cromossomo 3, e que forma com E3 ubiquitina ligase um complexo que danifica a proteína-1 de ligação do DNA (DDB-1), culina-4A (CUL4A) e reguladores de culina-1 (ROC1) levando à alterações no desenvolvimento embrionário (ANGERS et al., 2006). A ligação da subunidade glutarimídica ao CRBN promove o recrutamento dos fatores de transcrição Ikaros (IKZF1) e Aiolos (IKZF3) ao complexo E3, levando então a ubiquitinação e degradação de proteínas e substratos (CHAMBERLAIN et al., 2014; LIU et al., 2015). Dessa forma, no planejamento dos novos derivados ftalimídicos procurou-se eliminar o centro assimétrico a fim de evitar problemas relativos à teratogenicidade.

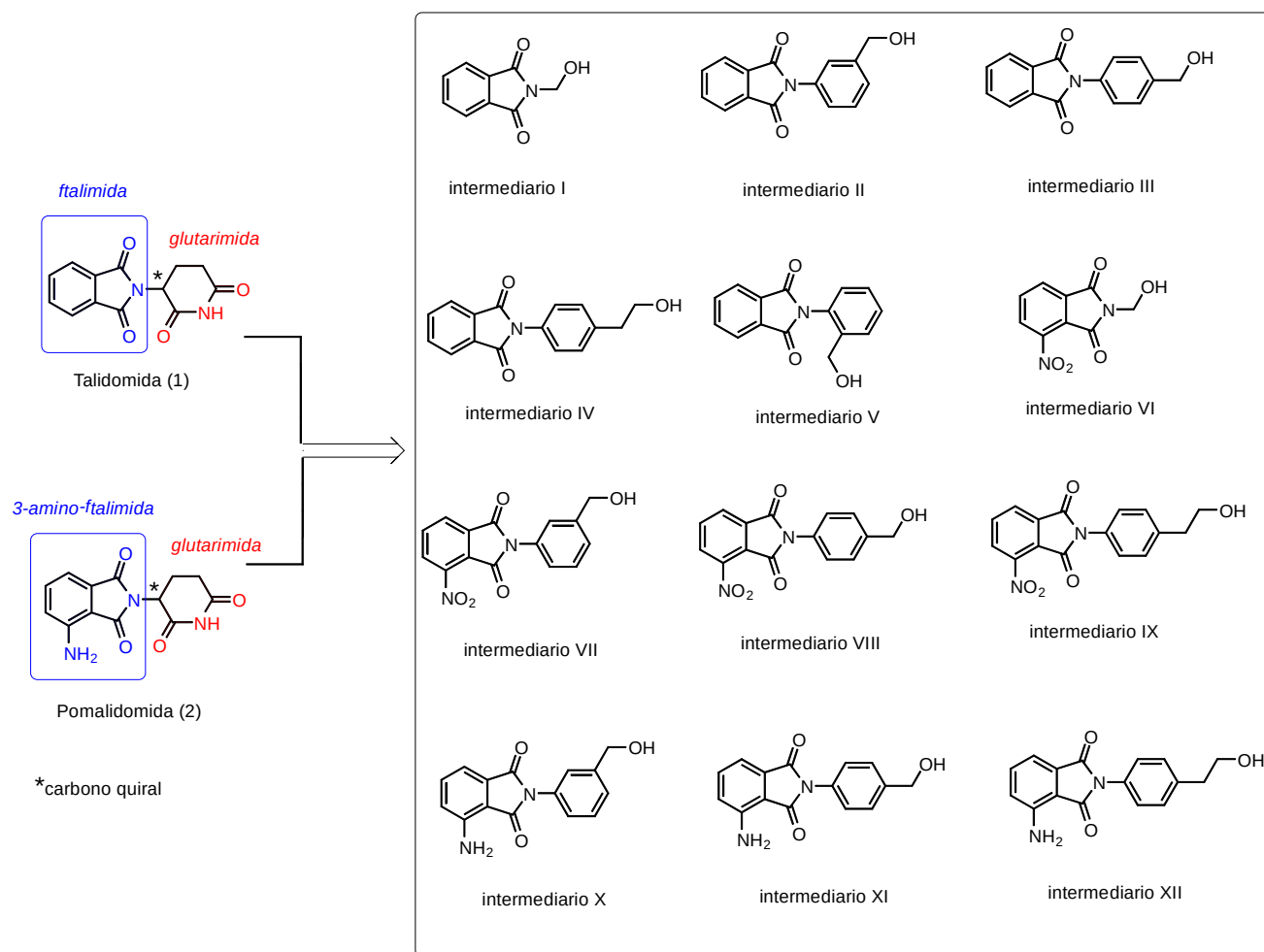


Figura 14. Planejamento dos derivados ftalimídicos (intermediários I – XII) a partir da estruturas dos IMiDs talidomida (1) e pomalidomida (2).

Após síntese dos derivados ftalimídicos, realizou-se uma série de ensaios de farmacológicos com objetivo de identificar os derivados mais potente na inibição das citocinas TNF- α e IL-1 β , que foi utilizado na segunda etapa do planejamento estrutural.

Para a segunda etapa, utilizando a estratégia especial de modificação denominada latenciação, foi planejada uma nova série de estruturas químicas planejadas como pró-fármacos e contendo as subunidades farmacofóricas: a) do

fármaco parental ácido micofenólico (AM); b) subunidade ftalimídica previamente identificada como a mais ativa na modulação dos níveis de TNF- α e IL-1 β (Figura 8).

O ácido micofenólico (**A**) é um composto com baixa biodisponibilidade após administração oral e a presença da função ácido carboxílico livre é passível de sofrer reações de metabolização (Fase 2) no organismo. A subunidade ftalimídica do intermediário VII é um modulador dos níveis das citocinas e do óxido nítrico (NO). Esta subunidade contribuirá com aumento da lipofilicidade, podendo aumentar assim a biodisponibilidade oral. A presença de uma função éster na nova molécula(pró-fármaco) promove mascaramento da função ácido carboxílico impedindo reações de conjugação metabólica (metabolismo fase 2).

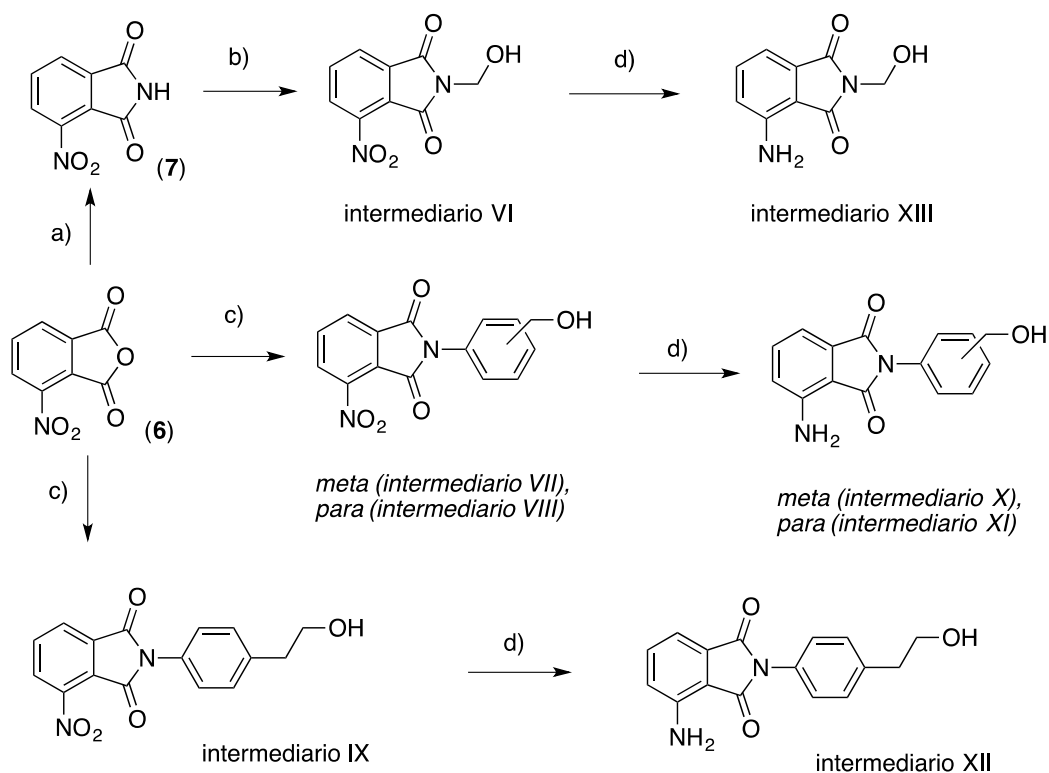
A inibição da enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH) associada à capacidade de inibição de TNF- α e IL-1 β representa uma nova abordagem para ação imunossupressora

4.4.2. Metodologia sintética

Para obtenção dos compostos planejados realizou-se duas etapas sintéticas principais, a saber: a) preparação dos derivados ftalimídicos devidamente funcionalizados; b) condensação do derivado ftalimídico mais ativo com ácido micofenólico a fim de se obter o pró-fármaco desejado.

Na primeira etapa realizou-se a condensação do anidrido ftálico com derivados aminados devidamente funcionalizados (descritos no planejamento estrutural) para obtenção das ftalimidas desejadas (Figura 9 e 10). As reações de condensação para obtenção dos derivados ftalimídicos são bem descritas e fornecem os produtos em altos rendimentos com formação mínima de impureza

(YAMASAKI et al., 2016; SANTOS et al., 2011; SANTOS et al., 2012; MACHADO et al., 2005; LIMA et al., 2002).



a) ureia, 140°C, 20 min; b) formaldeído, água, refluxo, 2h; c) arilaminas funcionalizadas, piridina, refluxo, 3-6hs.
d) NH_4Cl , Fe^0 , etanol, t.a.. 2-6h;

Figura 15. Rota sintética para obtenção dos derivados nitro-ftalimídicos e amino-ftalimidicos funcionalizados.

Utilizando o mesmo esquema reacional, 3-nitro-ftalimidas foram reagidas com arilaminas funcionalizadas para obtenção dos derivados 3-nitro-ftalimídicos (intermediários VI-IX). A partir desses derivados foi realizada a redução do grupamento nitro usando ferro e cloreto de amônio em meio etanólico para obtenção dos respectivos derivados aminados em bons rendimentos reacionais (KLAUSEN et al., 1995; HOFFSTETTER et al., 2006).

A segunda etapa reacional envolveu a condensação do derivado ftalimídico com ácido micofenólico (AM) a fim de se obter o pró-fármaco desejado. Para tal, reagiu o AM com o intermediário VII em meio de acetonitrila, usando como agente acoplante (carbonildiimide) (CDI) (Figura 11).

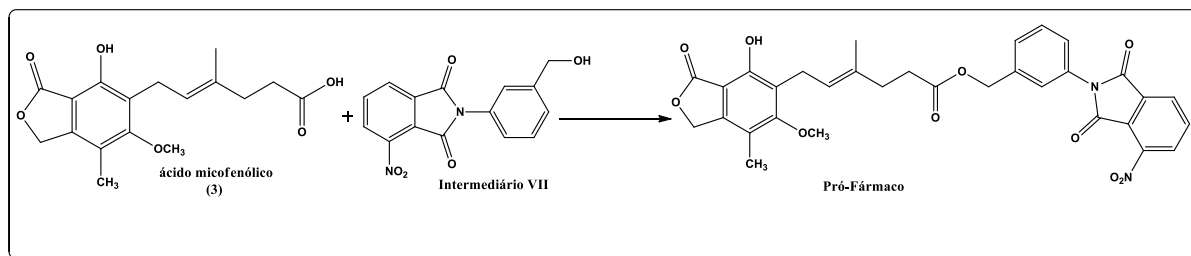
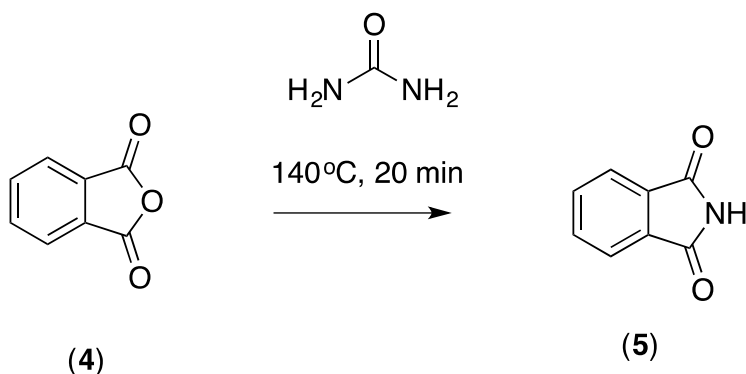


Figura 16. Rota sintética para obtenção do pró-fármaco derivado do ácido micofenólico.

4.4.3. Procedimentos Experimentais

4.4.3.1. Síntese da 1,3-isoindolinodiona (adaptado de FURNISS et al., 1991)

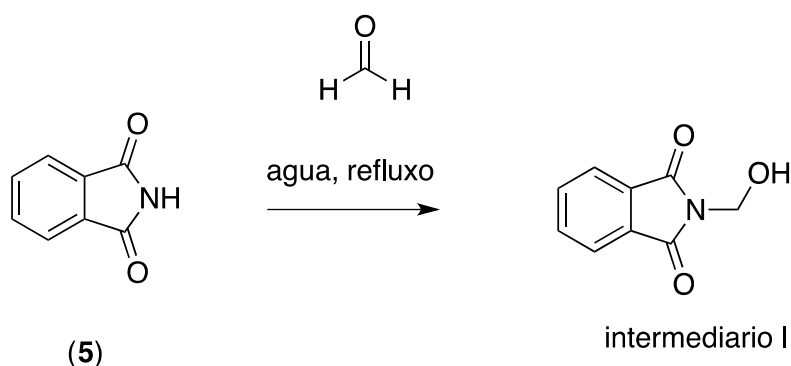


Em um balão de fundo redondo adicionou-se 2,5g (16,67 mmol) de anidrido ftálico (4) e 0,5g (8,3 mmol) de uréia. Essa mistura foi aquecida até 140°C , temperatura essa em que há fusão dos compostos. A reação foi mantida por 20 minutos até observação de um precipitado branco. Para o isolamento, a mistura reacional foi resfriada e foi adicionada água gelada e filtrado. O sólido de cor

Material e Métodos

branca obtido foi lavado com cerca de 300 mL de água, filtrado e seco a pressão reduzida. Este sólido, foi ainda recristalizado em uma mistura hidrolacólica 1:1 para fornecer 1g (82%) da ftalimida (**5**) como cristais de cor branca e faixa de fusão 232°-234° C ($C_8H_5NO_2$; PM = 147).

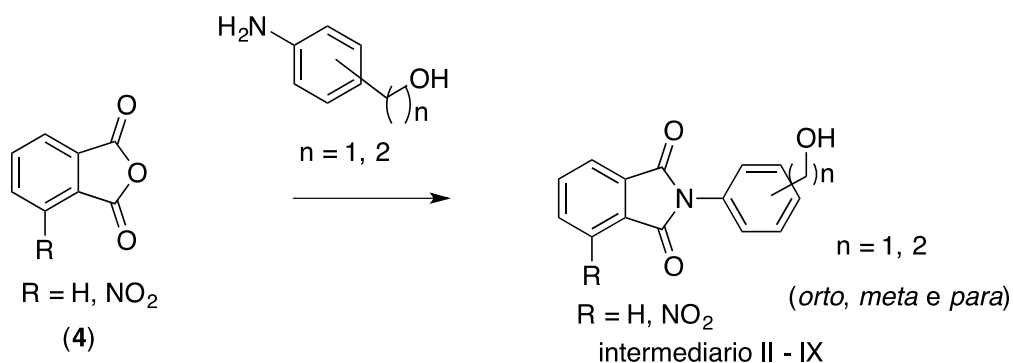
4.4.3.2. Síntese da 2-(hidroximetil)-1H-isindol-1,3(2H)-diona (adaptado de MANO & SEABRA, 2002).



Em um balão de fundo redondo, foi adicionado 12,5 g de ftalimida (**5**) (0,85 mmol), 8,1 g de formaldeído (0,1 mol; 7,35 mL de solução de aldeído fórmico 37%, $d = 1,10$ g/mL) e 45 mL de água destilada. A mistura foi aquecida em refluxo até obtenção de uma solução límpida. Após 1 hora, realizou-se filtração a quente e deixou-se resfriar lentamente para obtenção de cristais. Estes foram coletados por filtração, lavados com água gelada e secos sob pressão reduzida para obter 14g (93%) de um cristal branco com faixa de fusão 141°-143°C ($C_9H_7NO_3$; PM = 177,16).

Material e Métodos

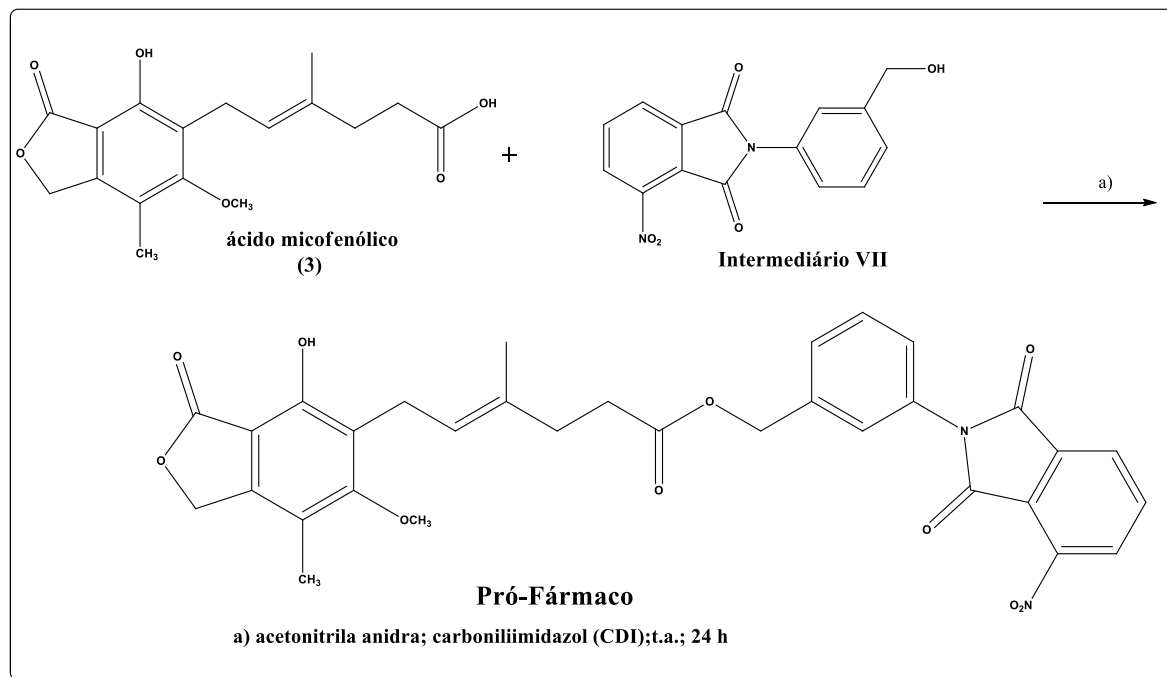
4.4.3.3. Procedimento sintético geral para obtenção dos derivados ftalimidicos e nitro-ftalimidicos substituídos.



Em um balão de fundo redondo acoplado a sistema de refluxo foi adicionado 0,148g (1 mmol) do anidrido ftálico (ou 3-nitro-ftálico), 1 mmol da respectiva amina funcionalizada e 10 mL de piridina anidra. A mistura reacional foi aquecida a 130°C por tempos que variaram entre 3-8 horas. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada até que indicasse término reacional (fase móvel: 6 hexano:4 acetato de etila). A mistura reacional foi resfriada e diluída com 60 mL de diclorometano. A fase orgânica foi lavada com solução de sulfato de cobre 10% até que a coloração do sulfato de cobre fosse de tom azulado-claro. A fase orgânica foi separada, seca com sulfato de sódio anidro e filtrada. Este filtrado foi evaporado a pressão reduzida e o material obtido foi purificado por cromatografia em coluna (fase móvel: 6 hexano:4 acetato de etila) para obtenção dos derivados ftalimídicos desejados em rendimentos variáveis.

4.4.3.4. Procedimento sintético geral para obtenção do pró-fármaco.

Reação geral:



Procedimento:

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 525mg (2 mmol) de ácido micofenólico (3) com 400 mg (2,2 mmol) de CDI e 10 mL de acetonitrila anidra, a reação permaneceu sob agitação por 1 hora em atmosfera de nitrogênio, para que haja o acoplamento. Após este tempo, adicionou-se 595,5 mg (2 mmol) do intermediário ftalimídico, a reação foi mantida por agitação a temperatura ambiente por 24 horas. A reação foi acompanhada utilizando CCD e como fase móvel (9: diclorometano: 1 acetato de etila). No término da reação rotaevaporou-se o solvente da reação e realizou-se a extração utilizando o diclorometano, como fase orgânica e água, como fase aquosa. A reação foi purificada em coluna cromatográfica utilizando-se sílica gel como fase estacionária e como fase móvel (9: diclorometano: 1 acetato de etila). Obtendo-se um sólido amarelo. (PM= 600,11 e C₃₂H₂₈N₂O₁₀).

4.4.4. Metodologia analítica

4.4.4.1. Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.)

Utilizou-se cromatografia em camada delgada para o acompanhamento das reações. Foram utilizadas cromatofolhas de alumínio (AL TLC) de sílica-gel 60 F254 Sigma[®], para o acompanhamento das reações e das purificações dos compostos sintetizados. A visualização das substâncias foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365nm), e/ou por exposição a iodo pulverizado e/ou revelador de grupos funcionais, a ninidrina, quando necessário.

4.4.4.2. Espectroscopia de RMN de ¹H

Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos com a utilização do Espectrômetro de 300 MHz Fourier com Dual probe– Bruker do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP). Os solventes utilizados foram CDCl₃ (clorofórmio) e (CD₃)₂SO (dimetilsulfóxido) deuterados.

4.4.4.3. Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do IV, compreendidos entre 4.000 a 400 cm⁻¹, foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro de infravermelho FTIR-8300 da SHIMADZU[®] Corporation, disponível no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

4.4.4.4. Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão dos compostos foram determinadas no aparelho Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific[®], disponível no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP.

4.4.5. Ensaios Biológicos

4.4.5.1. Obtenção dos macrófagos peritoneais

Os animais foram previamente inoculados por via intraperitoneal com 3mL de tioglicolato de sódio a 3%. Após 72 horas de estímulo, foram eutanasiados em câmara de CO₂. O peritônio foi então exposto em fluxo laminar para a retirada do exsudato peritoneal. Na porção mediana superior do abdômen foi injetado 5mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril em pH 7,2 e a 4°C, com auxílio de seringas e agulhas estéreis. Uma leve massagem manual foi realizada e as células do exsudato coletadas com seringa e dispensadas em tubo cônico estéril para preparo da suspensão celular. As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5mL de PBS pH 7,2 e centrifugadas a 400x g por 5 minutos em centrífuga a temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspenso em meio de cultura RPMI-1640 completo contendo 5% de FBS, 2-mercaptoetanol (2x 10⁻⁵M), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100 UI/mL) e l-glutamina (2 mM). Determinou-se o número de células em câmara hemocitométrica de Neubauer com a utilização como corante o líquido de Lázarus. As células foram ajustadas à concentração ideal (5x10⁶ células/mL) para cada ensaio em meio de RPMI-1640-C. Posteriormente, as células do exsudato peritoneal foram colocadas em placas e incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa com tensão constante de CO₂ para a aderência dos macrófagos. As células não aderentes foram retiradas com lavagens com meio de cultura RPMI-1640.

4.4.5.3. Ensaio de viabilidade de macrófagos

Para o ensaio de viabilidade dos macrófagos, utilizou-se a técnica de MTT (MOSMANN, 1983). Em microplaca de 96 poços foram incubadas suspensões celulares (100 µL por cavidade), na concentração de 5x10⁶ células/mL, por 60 minutos, para a aderência celular. As substâncias de interesse foram adicionadas e incubou-se por 24 horas a 37° C. Após o tempo de incubação, o conteúdo da placa foi vertido e 100 µL de solução de MTT a 1g/mL foi adicionado em cada poço. A placa foi então incubada por 3 horas a 37° C. Após esse período, o conteúdo da placa foi vertido e 100 µL de álcool isopropílico foram adicionados a

cada poço. Utilizou-se como controle positivo LPS e controle negativo o meio de cultura. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda, 540nm, com filtro de referência de 620 nm.

4.4.5.4.Obtenção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

As células peritoneais foram ajustadas na concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura de tecidos de 48 poços. Em cada cavidade foi adicionado 100 μ L de suspensão celular, e as placas incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa de CO₂. Após essa incubação, as células não aderentes foram retiradas por lavagens com meio de cultura RPMI-1640.

Nos ensaios de inibição da produção de citocinas são adicionados 100 μ L de RPMI-1640-C, 100 μ L das substâncias testadas em diferentes concentrações e 100 μ L de LPS a 1 μ g/mL aos macrófagos que estão aderidos à placa. Utiliza-se como controle positivo LPS 1 μ g/mL (300 μ L) e meio de cultura RPMI-1640-C (300 μ L) como controle negativo. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ por mais 24 horas. O conteúdo das placas foi então transferido para *eppendorfs*, que por sua vez foram centrifugados a 7800x g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados, aliquotados em *eppendorfs* e estocados em freezer a -80°C até a determinação das citocinas através do teste imunoenzimático ELISA sanduíche.

4.4.5.5. Determinação quantitativa da inibição das citocinas TNF- α e IL-1 β

As citocinas TNF- α e IL-1 β foram quantificadas no sobrenadante das culturas de células do exsudato peritoneal pelo teste imunoenzimático ELISA. Utilizou-se kits da BD e os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

As placas de 96 orifícios foram adsorvidas com 100 μ L de anticorpo de captura monoclonal obtido de rato e anti-citocina de camundongo, na

concentração apropriada a cada citocina em PBS pH 7,0, e incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS pH 7,0 contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 200µL/poço de PBS pH 7,0 contendo 10% de diluente de ensaio à temperatura ambiente, por 1 hora. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida adicionou-se 100µL por poço do padrão das citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 2 horas e lavadas 3 vezes com tampão de lavagem.

Em seguida, foram adicionados 100 µL por poço de anticorpo anti-citocina de camundongo marcado com biotina e diluído à concentração adequada de cada citocina no diluente de ensaio. As placas foram incubadas por mais 2 horas a temperatura ambiente e então lavadas mais 3 vezes com tampão de lavagem.

Depois foram adicionadas 100µL do conjugado peroxidase-estreptavidina (diluído à concentração adequada de cada citocina em diluente de ensaio) em cada poço, e incubou-se as placas por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e em seguida adicionou-se 100µL do substrato [10 mM de tampão citrato-fosfato, contendo 0,4 mM de tetrametilbenzidina e 1,2 mM de H₂O₂] a cada poço. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 2N adicionado a cada cavidade. A absorvância foi lida em 450 nm com filtro de referência em 570nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas. As concentrações de cada citocina foram quantificadas através de curva padrão previamente estabelecida com quantidades conhecidas de cada citocina. Os testes foram realizados em duplicata e os resultados foram expressos em picogramas/mL.

4.4.5.6. Inibição da produção de óxido nítrico

O teste de inibição de óxido nítrico foi realizado através da reação de redução do reagente de Griess. Foram utilizados 50 µL de sobrenadante dos macrófagos peritoniais de camundongos Swiss e das diluições das substâncias nas concentrações de 50; 25 e 12,5, LPS (controle negativo) e o controle negativo. Adiciona-se 50µL de reagente de Griess, incubou-se em estufa de CO₂ a 37°C por 30 minutos, após este tempo, a absorvância foi lida em espectrofotômetro no

comprimento de 540 nm. A quantidade de NO liberado foi calculada a partir de curva padrão previamente estabelecida e os valores serão expressos em μmol s de nitrito.

4.4.5.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.01 aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância a 95% ($p < 0,05$), através de comparações pelo teste de Dunnett. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

4.5. Ensaios *in silico*

4.5.1. Predição das Propriedades Físico-Químicas e Tóxicas de pequenas moléculas: pkCSM

Realizou-se a predição da farmacocinética e das propriedades tóxicas *in silico* utilizando o programa pkCSM (<http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsml>). Esta é uma base de dados criada e mantida nos supercomputadores da Universidade de Cambridge (Inglaterra) que se baseia no modelo matemático de assinaturas gráficas. Este modelo codifica padrões de distância entre átomos e são usados para representar as estruturas químicas e treinar modelos preditivos através da utilização de descritores (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

Foram estudados os seguintes parâmetros: o cálculo de Log P, os aceptores e doadores de hidrogênio, a solubilidade em água ($\log \text{mol/L}$) e a absorção intestinal em porcentagem (%).

5. RESULTADOS

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) e os dados de espectrofotometria na região do infravermelho estão apresentados na seção Anexo II. Para auxílio na interpretação dos espectros foram utilizadas as seguintes referências: (SANTOS et al., 2011; SANTOS et al., 2012; SILVERSTEIN et al., 1994; PAVIA et al., 1996).

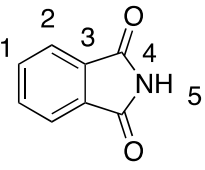
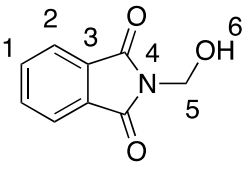
5.1. Síntese dos intermediários ftalimídicos

5.1.1. Síntese do 2-(hidroximetil)isoindolin-1,3-diona (intermediário I)

O composto foi obtido em duas etapas, em que inicialmente houve reação do anidrido ftálico com uréia para formação da ftalimida. Explorando a acidez do hidrogênio ftalimidico, foi retirado o próton para formação do ânion ftalimida. Este atuando como nucleófilo foi reagido com formadeido 37% em meio aquoso para formação do intermediário I. O produto obtido apresentou-se como sólido branco, com rendimentos de 93% e faixa de fusão de 140 e 142°C ($\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_3$; PM= 177,16). Os compostos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) (Tabela 1) e espectrofotometria na região do infravermelho (Tabela 2).

Resultados

Tabela 1. Comparação dos deslocamentos químicos para o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio da ftalimida (**5**) e do intermediário I (RMN ^1H , 300 MHz, CDCl_3).

Posição	 (5)	 intermediário I
1	δ 7,81-7,84 (m; 4H)	δ 7,78 (dd; 2H; $J_o = 8,1$ Hz)
2	δ 7,81-7,84 (m; 4H)	δ 7,91 (dd; 2H; $J_o = 8,1$ Hz)
3	-	-
4	-	-
5	11,46	5,27 (2H, s)
6	-	-

Resultados

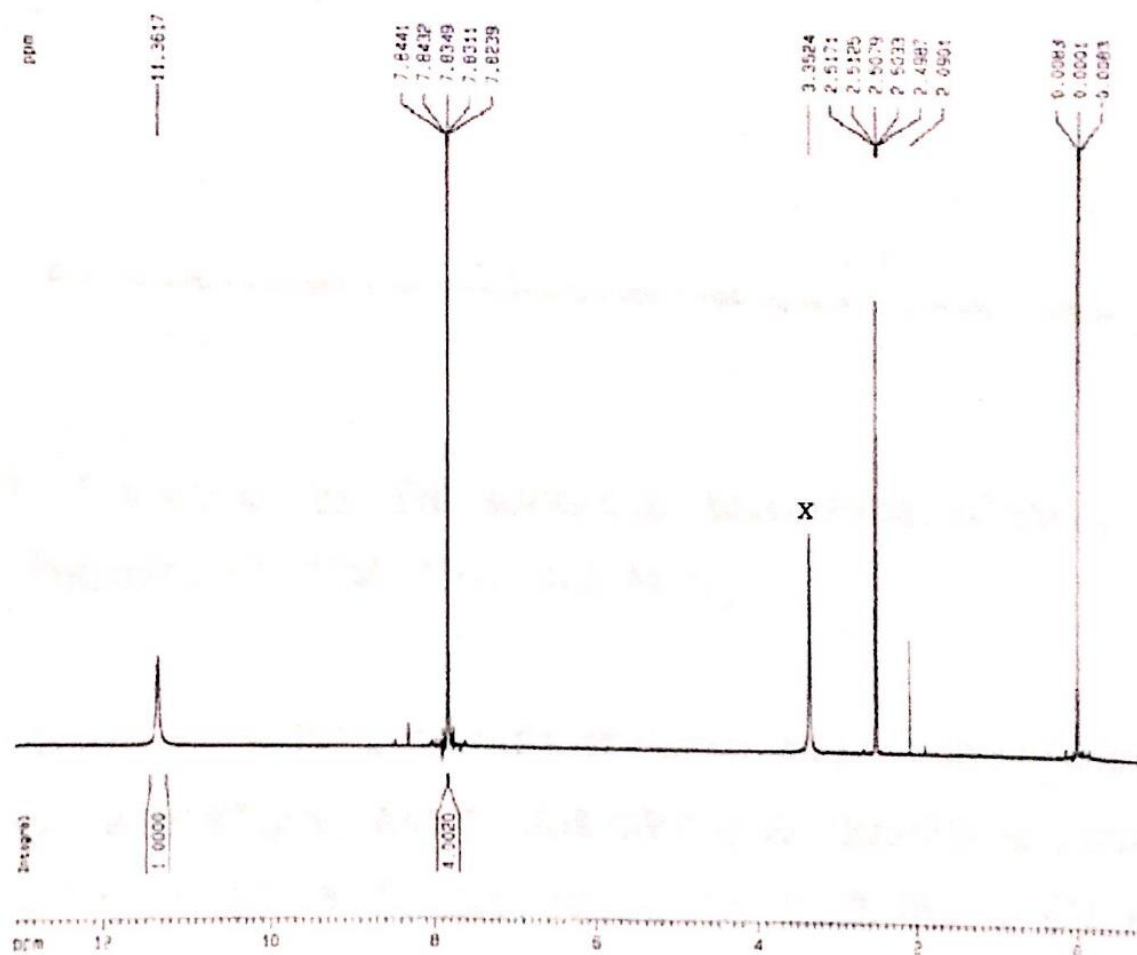


Figura 17. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) da ftalimida (5), X=pico de água ($\text{DMSO}-d_6$; 300 MHz).

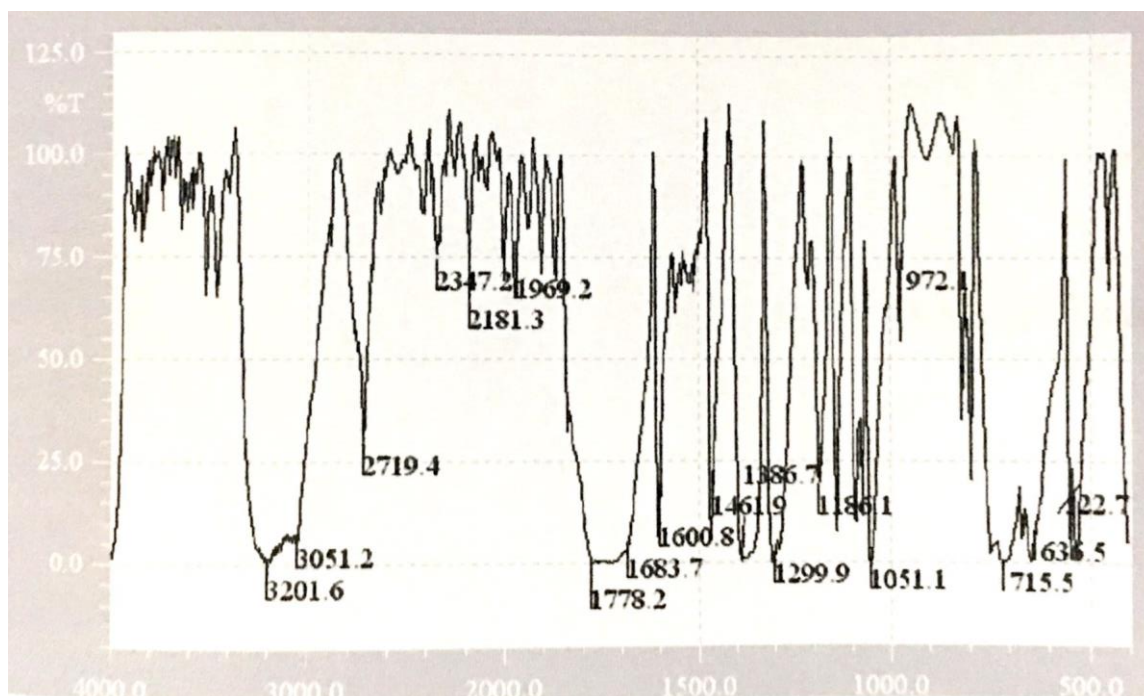


Figura 18. Espectrofotometria na região do infravermelho da fentalimida (**5**) (pastilha de KBr).

A Tabela 2 mostra comparativamente os deslocamentos observados na espectrofotometria na região do infravermelho.

Resultados

Tabela 2. Comparação dos deslocamentos obtidos por espectrofotometria na região do infravermelho para ftalimida (**5**) e intermediário I (pastilha de KBr).

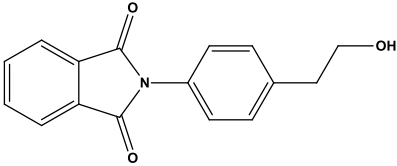
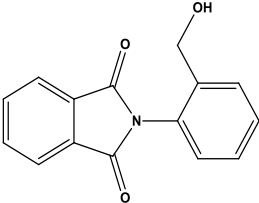
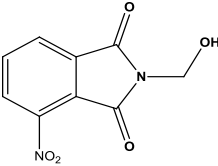
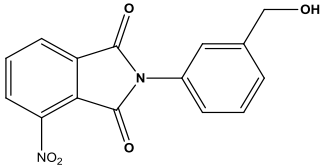
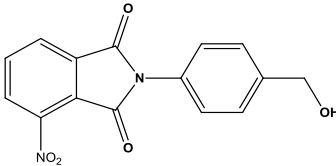
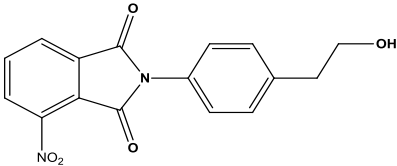
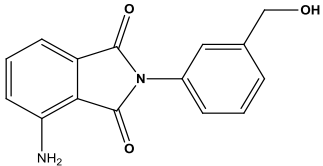
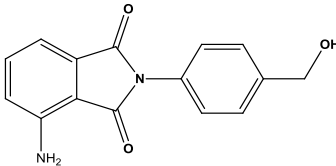
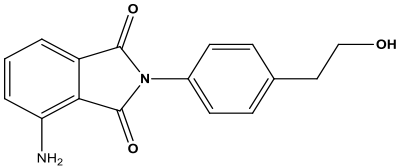
Estiramento	 (5)	 intermediário I
v O-H	-	3489 cm ⁻¹
v N-H	3201 cm ⁻¹	-
v C-H _{aromático}	3051 cm ⁻¹	3030 cm ⁻¹
v C-H _{alquílico}	-	2964 cm ⁻¹
v C=O _{imida}	1778 e 1683 cm ⁻¹	1772 e 1701 cm ⁻¹
v C-N-C _{imida}	1386 cm ⁻¹	1394 cm ⁻¹

A tabela 3 mostra os valores de rendimentos, faixa de fusão e peso molecular dos intermediários II a XII.

Tabela 3. Valores de rendimentos obtidos nas reações, faixa de fusão e peso molecular dos intermediários II-XII.

Compostos			
Rendimentos (%)	50	82	51
Faixa de Fusão (°C)	125-145	149-151	155-158
Peso Molecular (Da)	177,16	253,25	253,25

Resultados

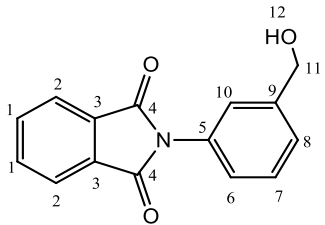
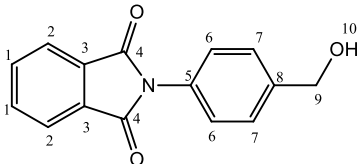
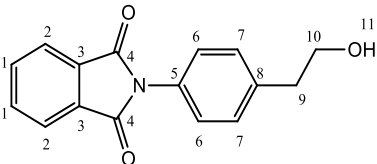
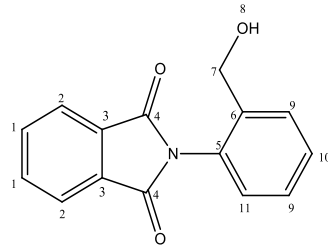
Compostos			
Rendimentos (%)	72	65	50
Faixa de Fusão (°C)	172-175	118-130	195-197
Peso Molecular (Da)	267,28	253,25	222,15
Compostos			
Rendimentos (%)	88	75	45
Faixa de Fusão (°C)	178-188	130-133	168-170
Peso Molecular (Da)	298,25	298,25	312,28
Compostos			
Rendimentos (%)	85	78	90
Faixa de Fusão (°C)	182-191	135-148	124-126
Peso Molecular (Da)	267,28	267,28	282,29

Resultados

Todos os intermediários foram caracterizados por métodos analíticos. Os intermediários II-XII foram caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) (Tabela 4, 5 e 6) e espectrofotometria na região do infravermelho (Tabela 7, 8 e 9).

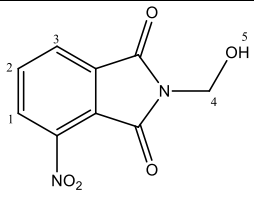
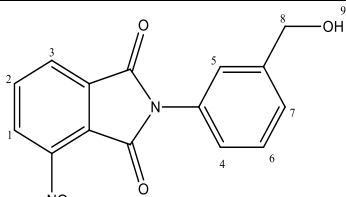
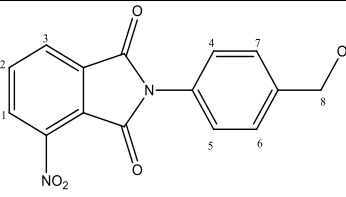
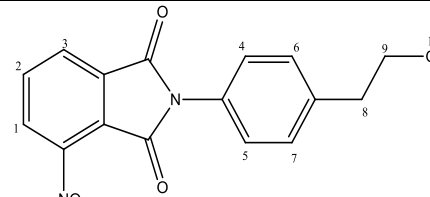
Resultados

Tabela 4. Comparação dos deslocamentos químicos para o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio dos intermediários II-V (RMN ^1H , 300 MHz, DMSO_{d6}).

Posição	 Intermediário II	 Intermediário III	 Intermediário IV	 Intermediário V
1	δ 7,82 (dd; 2H; $J_o = 7,8$ Hz)	δ 7,82 (dd; 2H; $J_o = 8,1$ Hz)	δ 7,82 (dd; 2H; $J_o = 8,0$ Hz)	δ 7,82 (dd; 2H; $J_o = 8,0$ Hz)
2	δ 7,95 (dd; 2H; $J_o = 7,8$ Hz)	δ 7,95 (dd; 2H; $J_o = 8,1$ Hz)	δ 7,95 (dd; 2H; $J_o = 8,0$ Hz)	δ 7,95 (dd; 2H; $J_o = 8,0$ Hz)
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	δ 7,41 (d; 1H; $J_m = 1,8$ Hz)	δ 7,47 (d; 2H; $J_o = 7,9$ Hz)	δ 7,36-7,39(m; 2H)	-
7	δ 7,35-7,38 (m; 2H)	δ 7,40 (d; 2H; $J_o = 7,9$ Hz)	δ 7,36-7,39(m; 2H)	δ 3,50 (s; 2H)
8	δ 7,35-7,38 (m; 2H)	-	-	-
9	-	δ 4,57 (s; 2H)	δ 2,94 (t; 2H)	δ 7,37-7,40(m; 4H)
10	δ 7,51 (d; 1H; $J_m = 1,8$ Hz)	-	δ 3,91 (t; 2H)	
11	δ 4,77 (s; 2H)	-	-	

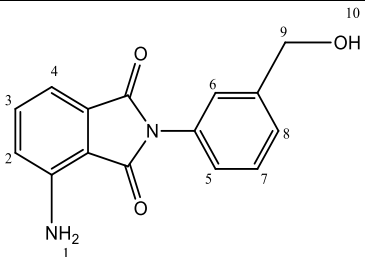
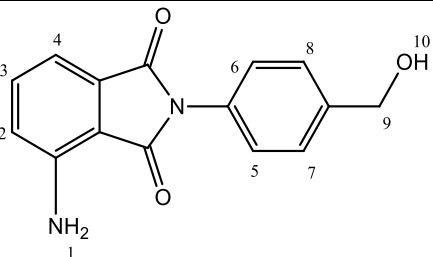
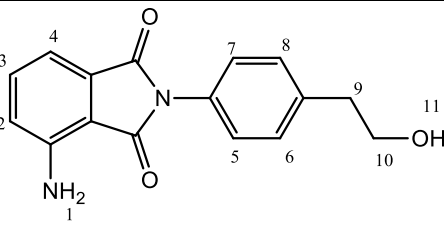
Resultados

Tabela 5. Comparação dos deslocamentos químicos para o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio dos intermediários nitro-ftalimídicos VI-IX (RMN ^1H , 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

Posição	 Intermediário VI	 Intermediário VII	 Intermediário VIII	 Intermediário IX
1	δ 8,65 (dd; 1H; J= 8,5 Hz)	δ 8,35 (dd; 1H; J=7,81 Hz)	δ 8,34 (d; 1H, J=8,3 Hz)	δ 8,34 (d; J= 8,2 Hz)
2	δ 8,17 (d; J= 8,2 Hz)	δ 8,12 (t; 1H; J=8 Hz)	δ 8,11 (d; 1H, J=8,2 Hz)	δ 8,10 (dd; J= 8,2 Hz)
3	δ 8,54 (d; 1H; J= 8,5Hz)	δ 8,25 (dd; 1H; J= 8Hz)	δ 8,25 (d; 1H, J=8,2 Hz)	δ 8,24 (d; J= 8,2 Hz)
4	δ 5,00 (d; 1H)	δ 7,40-7,47 (m; 3H)	δ 7,47 (dd; 2H, J=7,4 Hz)	δ 7,37 (dd, 2H; J= 7,8 Hz)
5	-	δ 7,55 (d; 1H)	δ 7,47 (dd; 2H, J=7,4 Hz)	δ 7,37 (dd, 2H; J= 7,8 Hz)
6	-	δ 7,40-7,47 (m; 3H)	δ 7,38 (dd; 2H, J=7,4 Hz)	δ 7,33 (dd; 2H; J= 7,8 Hz)
7	-	δ 7,40-7,47 (m; 3H)	δ 7,38 (dd; 2H, J=7,4 Hz)	δ 7,33 (dd; 2H; J= 7,8 Hz)
8	-	δ 5,14 (t)	δ 4,56 (d; 2H)	δ 2,78 (t; 2H)
9	-	-	δ 5,31 (t; 3H)	δ 3,66 (q; 2H)
10	-	-	-	δ 4,71 (t; 1H)
11	-	-	-	-

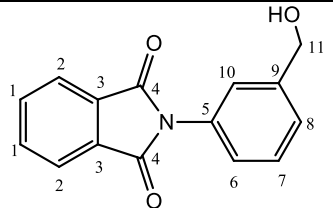
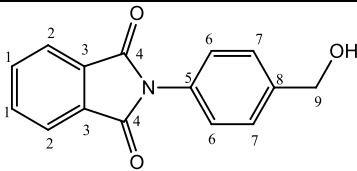
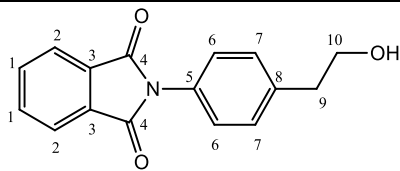
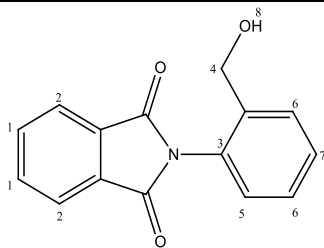
Resultados

Tabela 6. Comparação dos deslocamentos químicos para o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio dos intermediários amino-ftalimídicos X-XII (RMN ^1H , 300 MHz, DMSO_{d6}).

Posição	 Intermediário X	 Intermediário XI	 Intermediário XII
1	-	-	δ 6,55 (s, 2H)
2	δ 7,03-7,05 (m)	δ 7,31 (d,1H)	δ 7,03-7,07 (m)
3	δ 7,35 (d)	δ 8,03 (m)	δ 7,51 (dd; J=7,5 Hz)
4	δ 7,03-7,05 (m)	δ 7,55-7,67 (m)	δ 7,03-7,07 (m)
5	δ 7,43-7,52 (m)	δ 7,55-7,67 (m)	δ 7,28-7,36 (m)
6	δ 7,43-7,52 (m)	δ 7,55-7,67 (m)	δ 7,28-7,36 (m)
7	δ 7,35 (m)	δ 7,55-7,67 (m)	δ 7,28-7,36 (m)
8	δ 7,26 (d;1H;J=7,7 Hz)	δ 7,55-7,67 (m)	δ 7,28-7,36 (m)
9	δ 4,55 (d)	δ 5,09 (s)	δ 2,78 (t; 2H)
10	δ 5,32 (t)	-	δ 3,67 (q; 2H)
11	-	-	δ 4,71 (t; 1H)

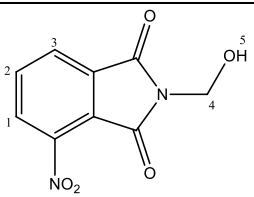
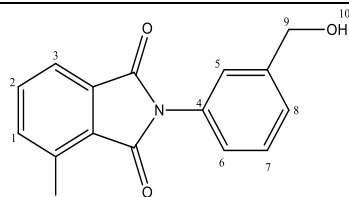
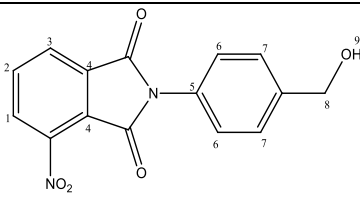
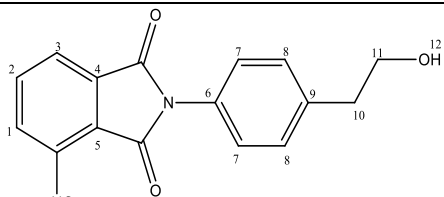
Resultados

Tabela 7. Comparação dos deslocamentos obtidos por espectrofotometria na região do infravermelho para os intermediários II-V .

Estiramento	 Intermediário II	 Intermediário III	 Intermediário IV	 Intermediário V
v O-H	3550 cm-1	3552 cm-1	3522 cm-1	3522 cm-1
v C-H _{aromático}	3082 cm-1	3082 cm-1	3066 cm-1	3065 cm-1
v C-H _{alquílico}	2937 cm-1	2916 cm-1	2931 cm-1	2931 cm-1
v C=O _{imida}	1772 e 1714 cm-1	1764 e 1705 cm-1	1768 e 1708 cm-1	1768 e 1708 cm-1
v C=C _{aromático}	1654 e 1488 cm-1	1600 e 1514 cm-1	1515 e 1471 cm-1	1541 e 1471 cm-1
v C-N-C _{imida}	1381 cm-1	1388 cm-1	1388 cm-1	1388 cm-1

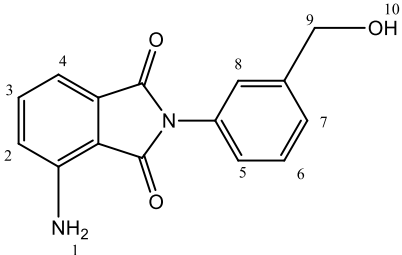
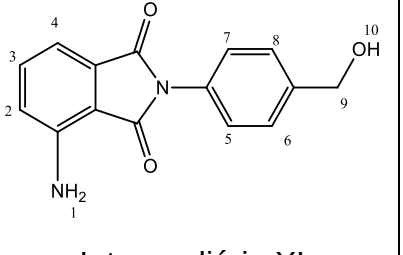
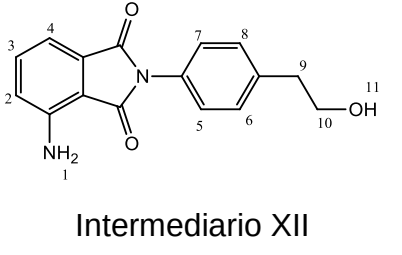
Resultados

Tabela 8. Comparação dos deslocamentos obtidos por espectrofotometria na região do infravermelho para os intermediários VI-IX.

Estiramento	 Intermediário VI	 Intermediário VII	 Intermediário VIII	 Intermediário IX
v O-H	3361 cm ⁻¹	3462 cm ⁻¹	3618 cm ⁻¹	3353 cm ⁻¹
v C-H _{aromático}	3046 cm ⁻¹	3130 cm ⁻¹	3120 cm ⁻¹	3112 cm ⁻¹
v C-H _{alquílico}	2775cm ⁻¹	2890 cm ⁻¹	2946 cm ⁻¹	2984 cm ⁻¹
v C=O _{imida}	1757 e 1624 cm ⁻¹	1764 e 1626 cm ⁻¹	1797 e 1625 cm ⁻¹	1762 e 1624 cm ⁻¹
v C=C _{aromático}	1447 cm ⁻¹	1476 cm ⁻¹	1477 cm ⁻¹	1403 cm ⁻¹
v C-N-C _{imida}	1396 cm ⁻¹	1313 cm ⁻¹	1304 cm ⁻¹	1364 cm ⁻¹
v N-O _{nitro}	1593 cm ⁻¹	1563 cm ⁻¹	1566 cm ⁻¹	1567 cm ⁻¹

Resultados

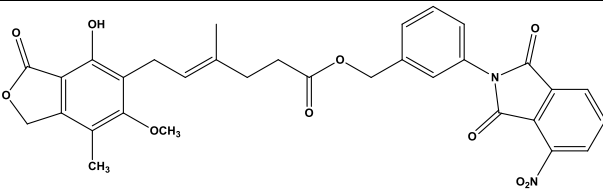
Tabela 9. Comparação dos deslocamentos obtidos por espectrofotometria na região do infravermelho para os intermediários X-XII.

Estiramento	 Intermediário X	 Intermediário XI	 Intermediário XII
v O-H	3542 cm ⁻¹	3480 cm ⁻¹	3514 cm ⁻¹
v C-H _{aromático}	3132 cm ⁻¹	3147 cm ⁻¹	3420 cm ⁻¹
v C-H _{alquílico}	2945 cm ⁻¹	2888 cm ⁻¹	2982 cm ⁻¹
v C=O _{imida}	1798 e 1648 cm ⁻¹	1768 e 1642 cm ⁻¹	1723 e 1649 cm ⁻¹
v C=C _{aromático}	1421 cm ⁻¹	1477 cm ⁻¹	1448 cm ⁻¹
v C-N-C _{imida}	1390 cm ⁻¹	1289 cm ⁻¹	1392 cm ⁻¹
v N-H _{amina}	3370 e 3466 cm ⁻¹	3054 cm ⁻¹	3383 cm ⁻¹

5.1.2. Síntese do pró-fármaco

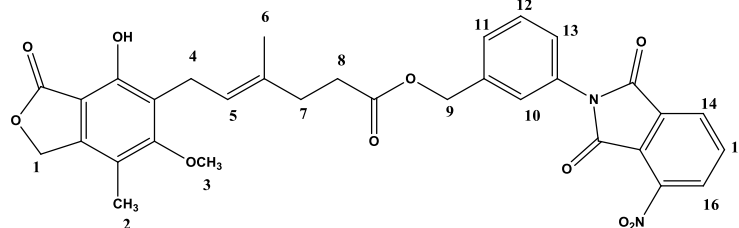
A reação de acoplamento foi possível utilizando como agente acoplante o CDI para a síntese do pró-fármaco, os valores de rendimento (%), a faixa de fusão e o peso molecular estão descritos na tabela a seguir:

Tabela 10: Valores de rendimentos obtidos nas reações, faixa de fusão e peso molecular do pró-fármaco (éster)

Pró-Fármaco	
Rendimentos (%)	18
Faixa de Fusão (°C)	145
Peso Molecular (Da)	600,17

Para a caracterização realizou-se os experimentos de RMN ^1H e a espectroscopia de infravermelho, e os resultados obtidos estão expressos na tabela seguir:

Tabela 11: Valores dos deslocamentos obtidos por espectrofotometria na região do infravermelho e de ressonância magnética nuclear do pró-fármaco (éster) obtido:



RMN de ^1H Infravermelho cm^{-1}	
H1= 5.20 (3H;m)	$\sqrt{(\text{C-H})_{\text{aromático}}} = 3101,5$
H2=2.08 (3H;m);	$\sqrt{(\text{O-H})_{\text{fenólico}}} = 3445$
H3=3.76 (3H;m)	$\sqrt{(\text{C-H})_{\text{alquílico}}} = 2930$
H4=3.73 (3H;d);	$\sqrt{(\text{C=O})_{\text{éster}}} = 1750, 1715$
H5=5.11 (1H;t)	$\sqrt{(\text{C-H})_{\text{aromático}}} = 3101,5$
H6=1.72 (3H;t)	$\sqrt{(\text{C-H})_{\text{aromático}}} = 3066,8$
H7=2.05 (2H; t); H8=2.08 (2H; t)	$\sqrt{(\text{C-O-C})} = 1114$
H9=5.18 (3H;s);	$\sqrt{(\text{N-O})_{\text{nitro}}} = 1610$
H10, H12, H13=8.24-8.26	$\sqrt{(\text{N-O})_{\text{nitro}}} = 1567$
H11=7.5	$\sqrt{(\text{C=O})_{\text{imida}}} = 1780$
H14,H16=8.32-8.35;	$\sqrt{(\text{C-N-C})} = 1357$
H15=8.11	$\sqrt{(\text{C=C})} = 1610 \text{ e } 1440$

5.2. Teste imunológico para detecção de inibição de TNF- α e IL-1 β

5.2.1. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos

A viabilidade celular de macrófagos murinos foi determinada na presença dos compostos utilizando o ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), desenvolvido por Mosmann e colaboradores (1983). Células viáveis com metabolismo ativo convertem nas mitocôndrias oMTT em um produto insolúvel púrpura conhecido como formazan, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional ao número de células vivas (Figura 14). Enquanto células mortas são incapazes de fazer esta conversão. A redução do MTT em formazana envolve a reação de redução com NADH em que há transferência de elétrons para o MTT.

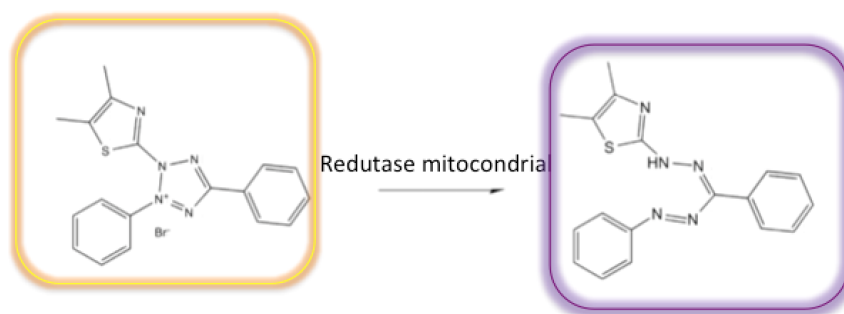
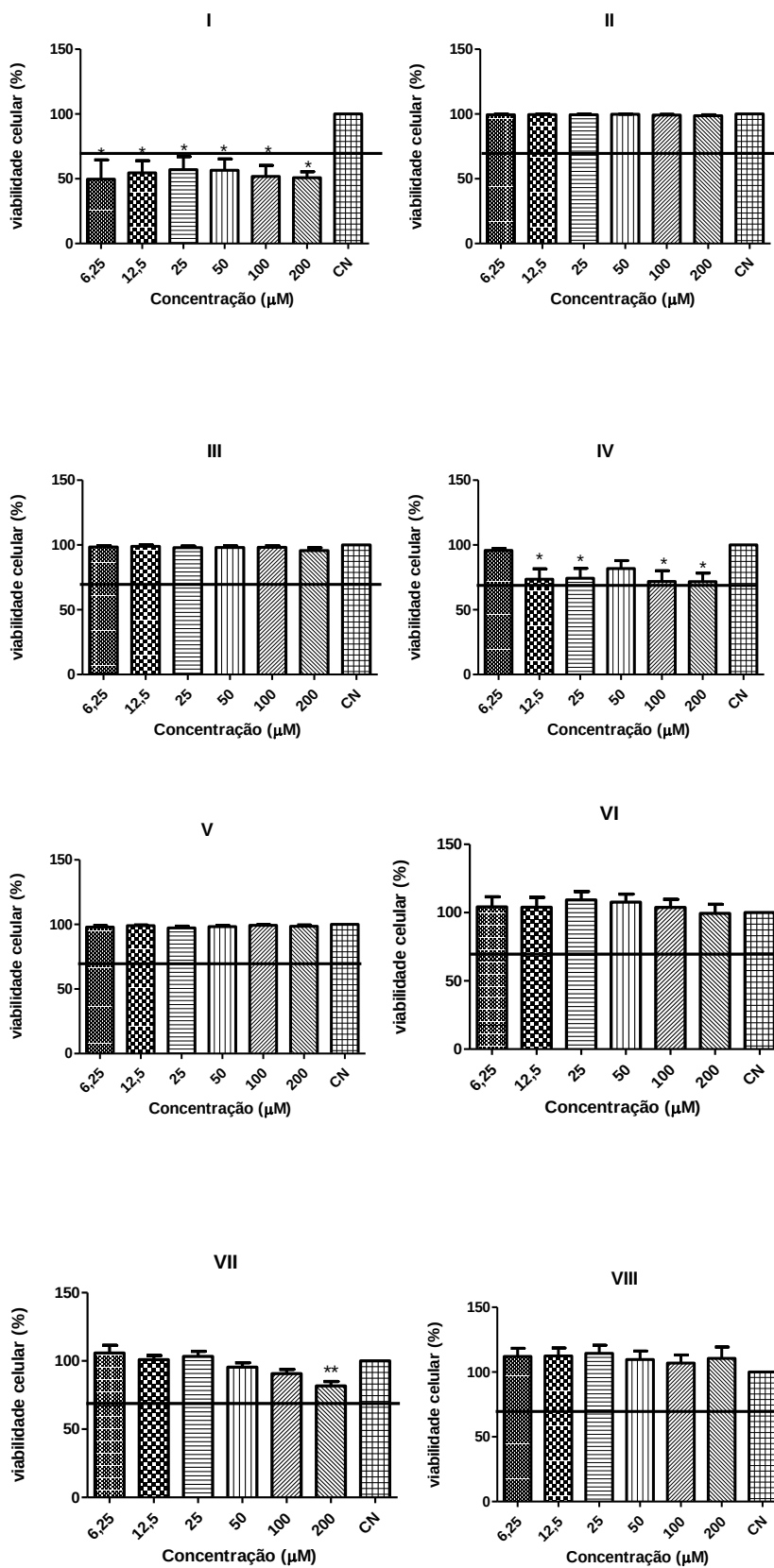


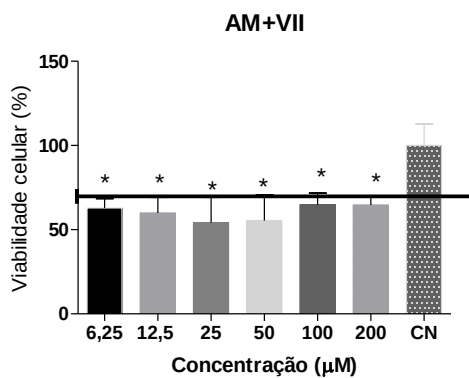
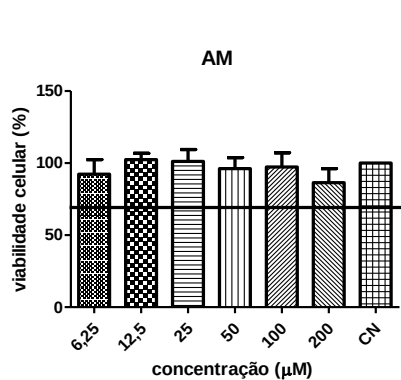
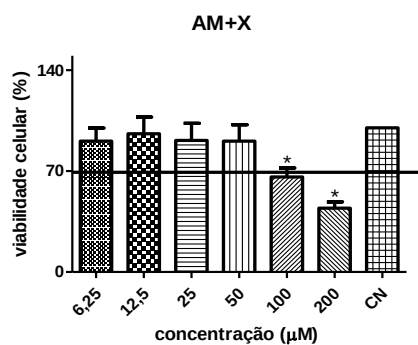
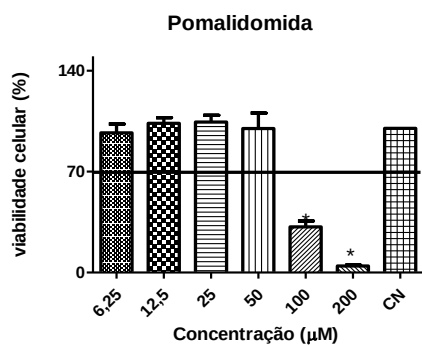
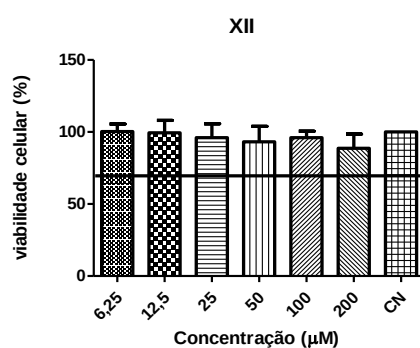
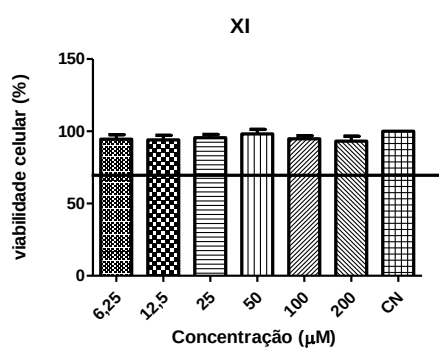
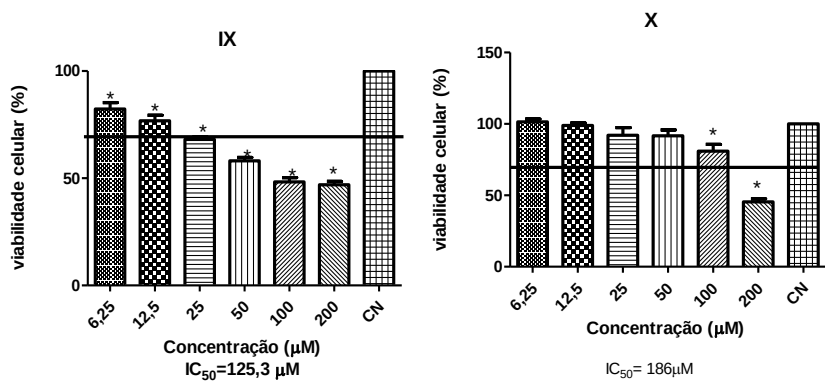
Figura 19. Redução do MTT para formazana pela enzima redutase mitocondrial.

A morte celular pode ser decorrente da formação dos cristais de formazana que contribuem para danificar as membranas celulares por perfuração durante a exocitose ou por mecanismo intracelulares ativados pelos compostos químicos.

Os intermediários ftalimídicos e os controles (ácido micofenólico e pomalidomida) foram testados nas seguintes concentrações em ordem crescente: 6,25 μ M; 12,5 μ M; 25 μ M; 50 μ M; 100 μ M e 200 μ M. Os resultados obtidos estão representados na Figura 15, a seguir.

Resultados





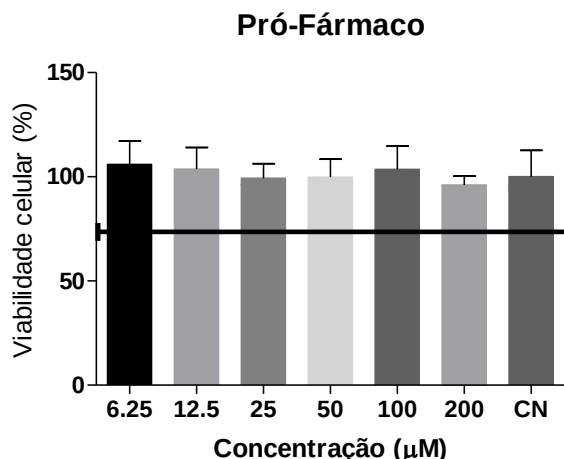


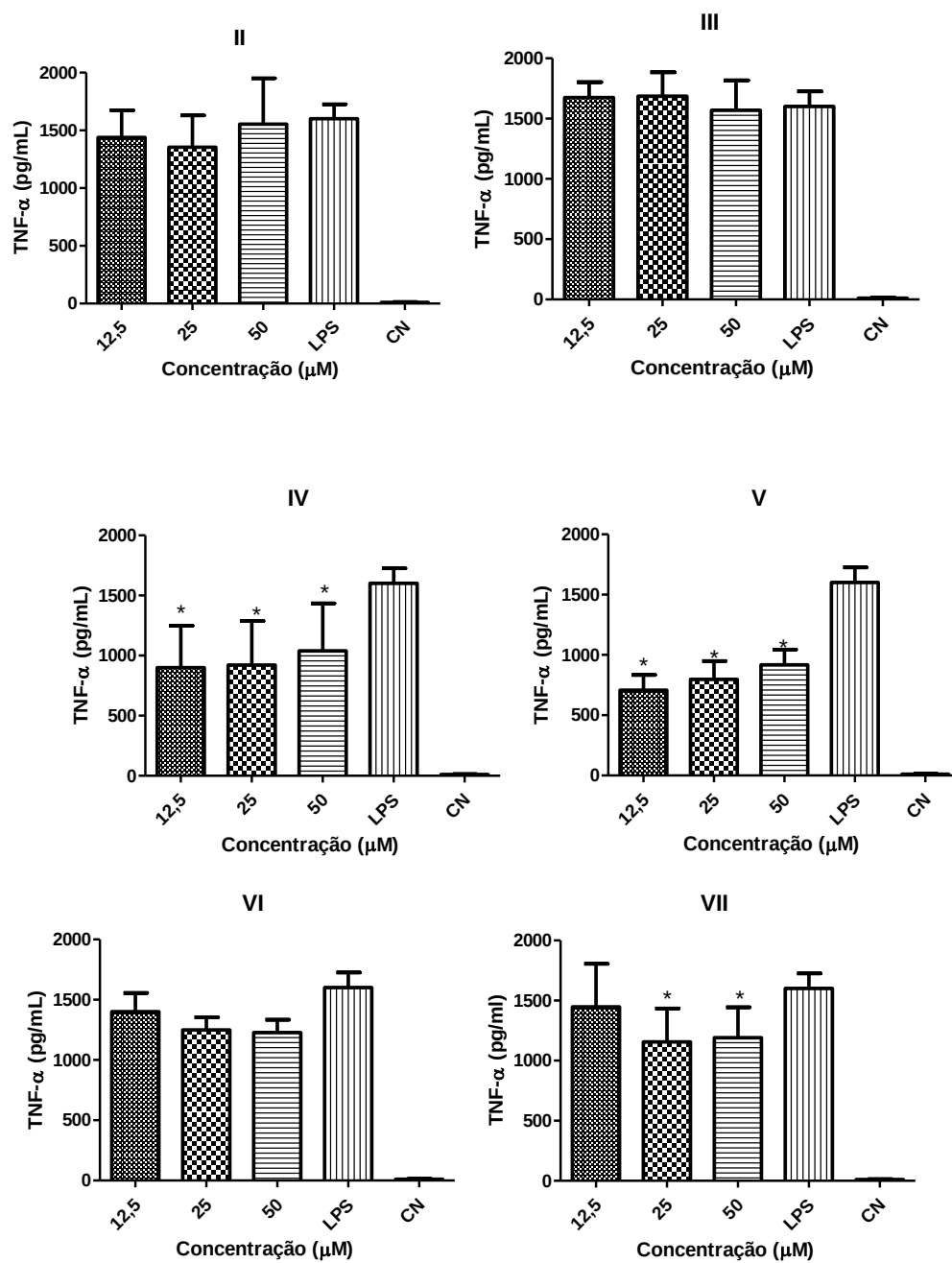
Figura 20. Viabilidade celular dos intermediários I-XII, AM e POM e do pró-fármaco em diferentes concentrações. As células em meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle negativo (CN), equivalendo a 100% de viabilidade. *, $p < 0.05$ comparado com controle negativo (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

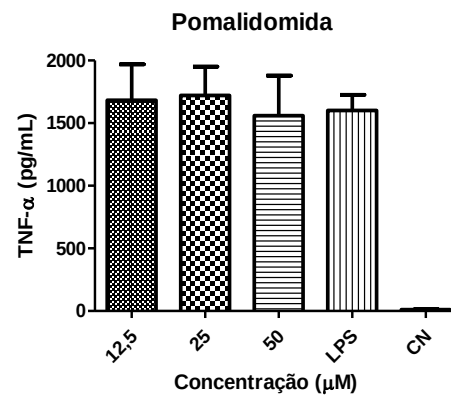
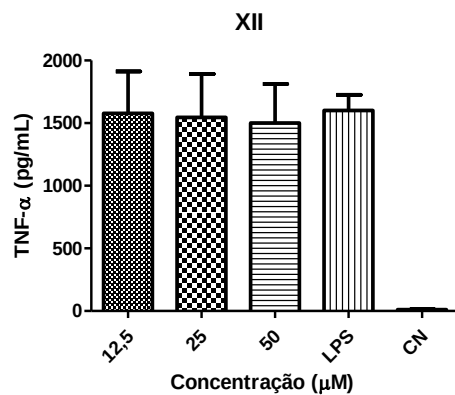
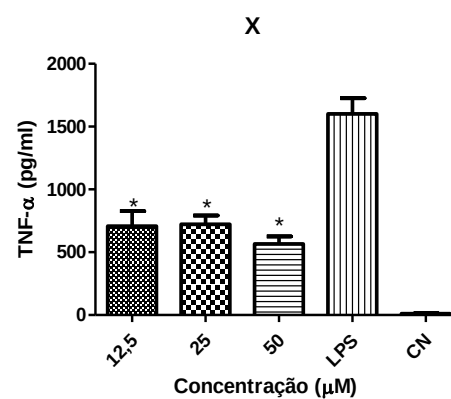
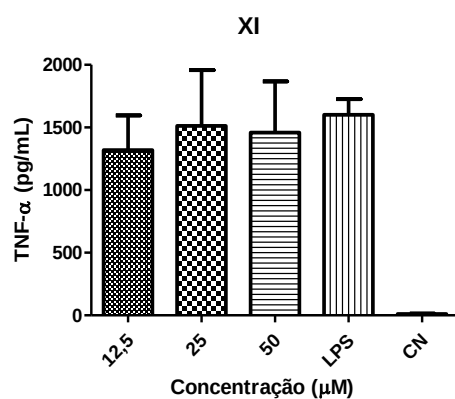
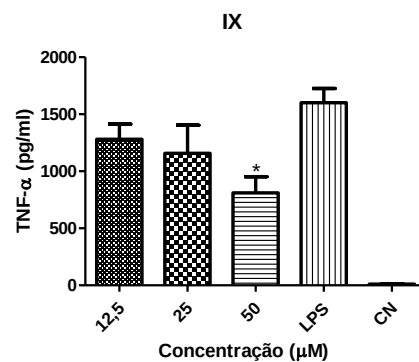
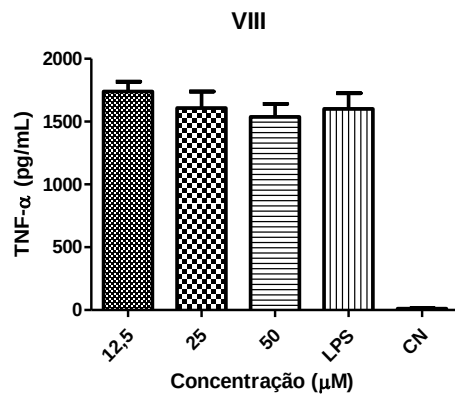
5.2.1.1. Determinação da inibição das citocinas TNF- α e IL- 1β nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais

Os compostos foram testados em três diferentes concentrações, escolhidas com base nos resultados obtidos no teste de viabilidade celular de macrófagos. As concentrações iguais e inferiores a $50\mu\text{M}$ mostram viabilidades acima de 75% para todos os compostos. Essa viabilidade foi selecionada a fim de evitar resultados que possam ensaio. Por isso, neste estudo foram selecionadas as concentrações de $12,5\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$.

5.2.1.1.1. Quantificação de TNF- α em macrófagos murinos

A quantificação de TNF- α em macrófagos murinos foi avaliada para os intermediários I-XII, para as concentrações $12,5\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$. Os resultados estão apresentados na Figura 16.





Resultados

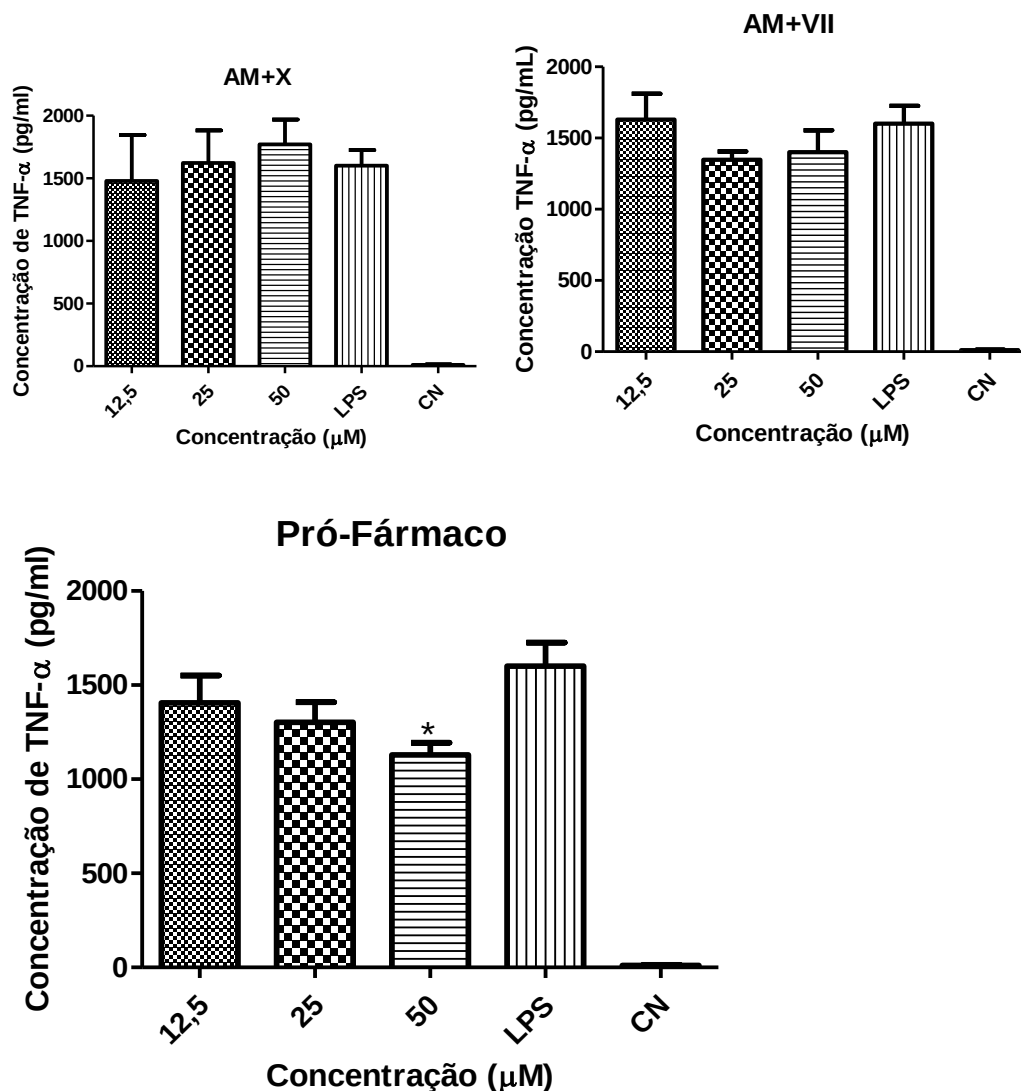


Figura 21. Quantificação de TNF- α liberado de macrófagos murinos incubados com os intermediários I-XII, AM, POM e pró-fármaco em diferentes concentrações, e estimulados com LPS. As células em meio de cultura (RPMI-1640) sem estímulo com LPS foram utilizadas como controle negativo (CN). *, $p < 0.05$ comparado com LPS (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

Observa-se pelos resultados apresentados nos gráficos que os compostos mais ativos para a inibição de TNF- α são os compostos V e X. O composto X, em todas as concentrações (50; 25 e 12,5 μ M) inibiu os níveis de TNF- α em valores superiores (655 pg/mL; 570 pg/mL e 505 pg/mL, respectivamente) em relação ao

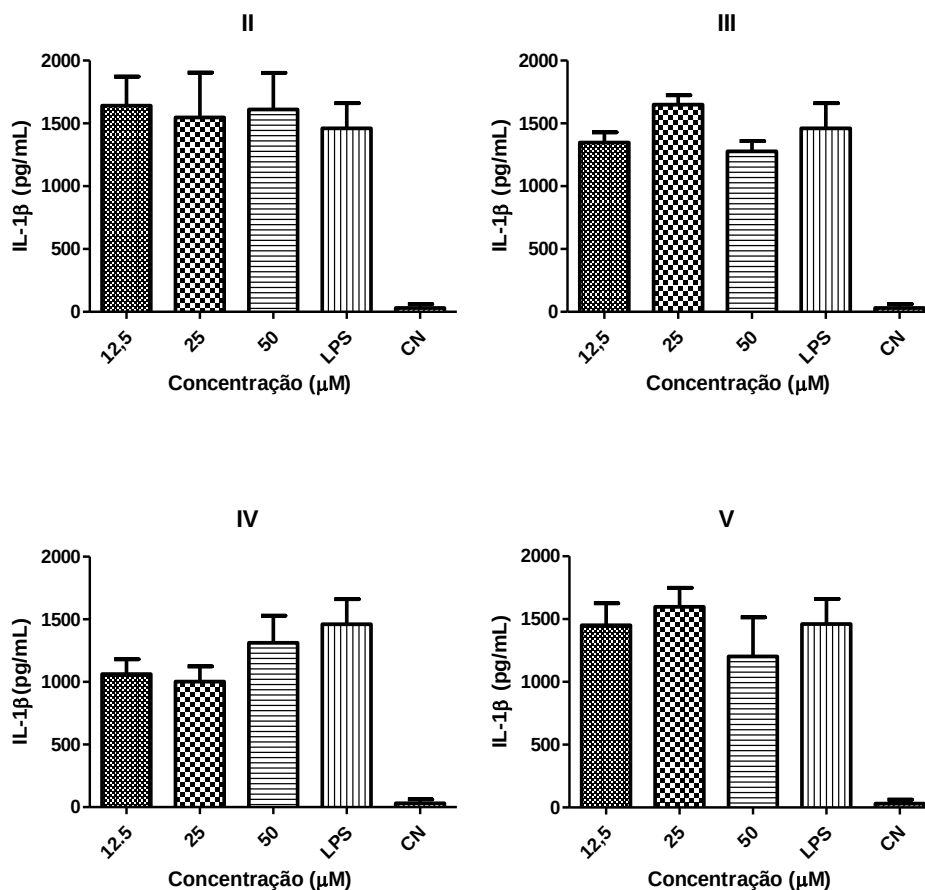
Resultados

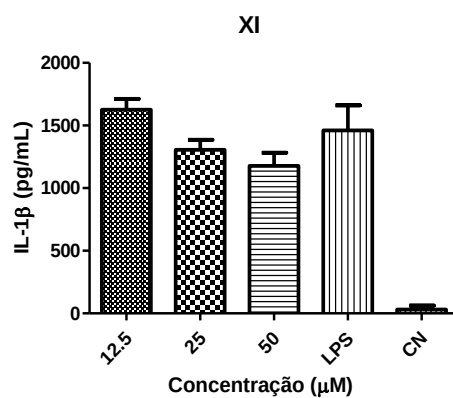
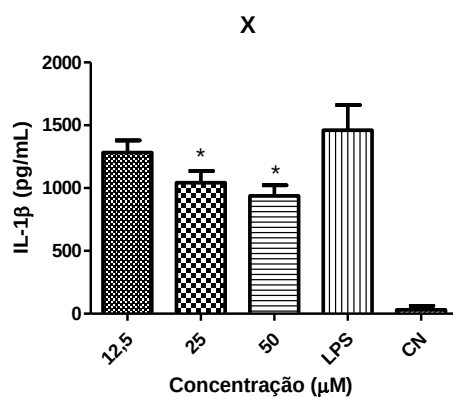
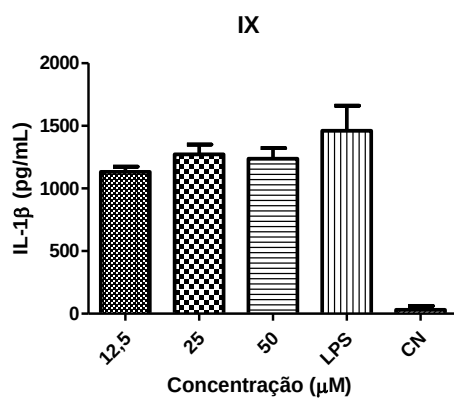
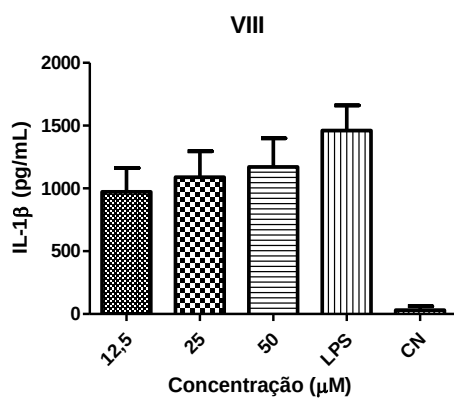
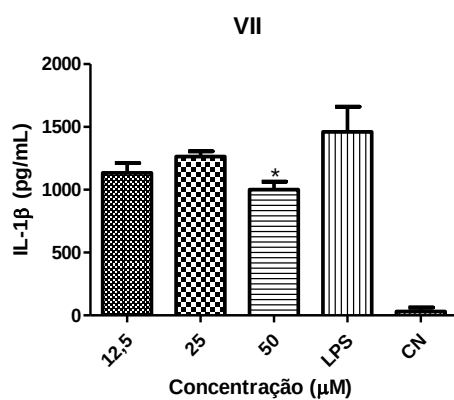
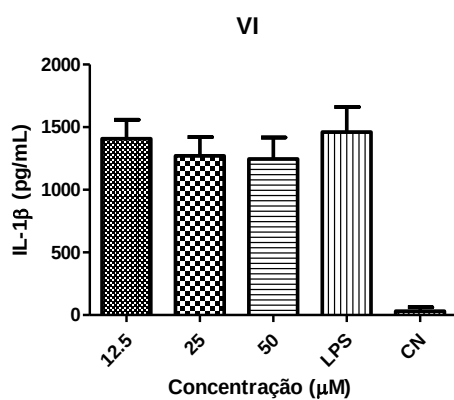
controle positivo (LPS), já o intermediário V apenas na concentração de 50 μM . Os compostos IV na concentração de 50 μM houve inibição significativa de $\text{TNF-}\alpha$.

A associação entre o intermediário X e o ácido micofenólico não demonstrou inibição significativa da produção de $\text{TNF-}\alpha$ nas concentrações testadas.

5.2.1.1.2. Determinação da inibição da produção de $\text{IL-1}\beta$ em macrófagos murinos

Os ensaios de inibição de $\text{IL-1}\beta$ também foram realizados nas concentrações de 12,5 μM , 25 μM e 50 μM . Os resultados estão apresentados na Figura 17.





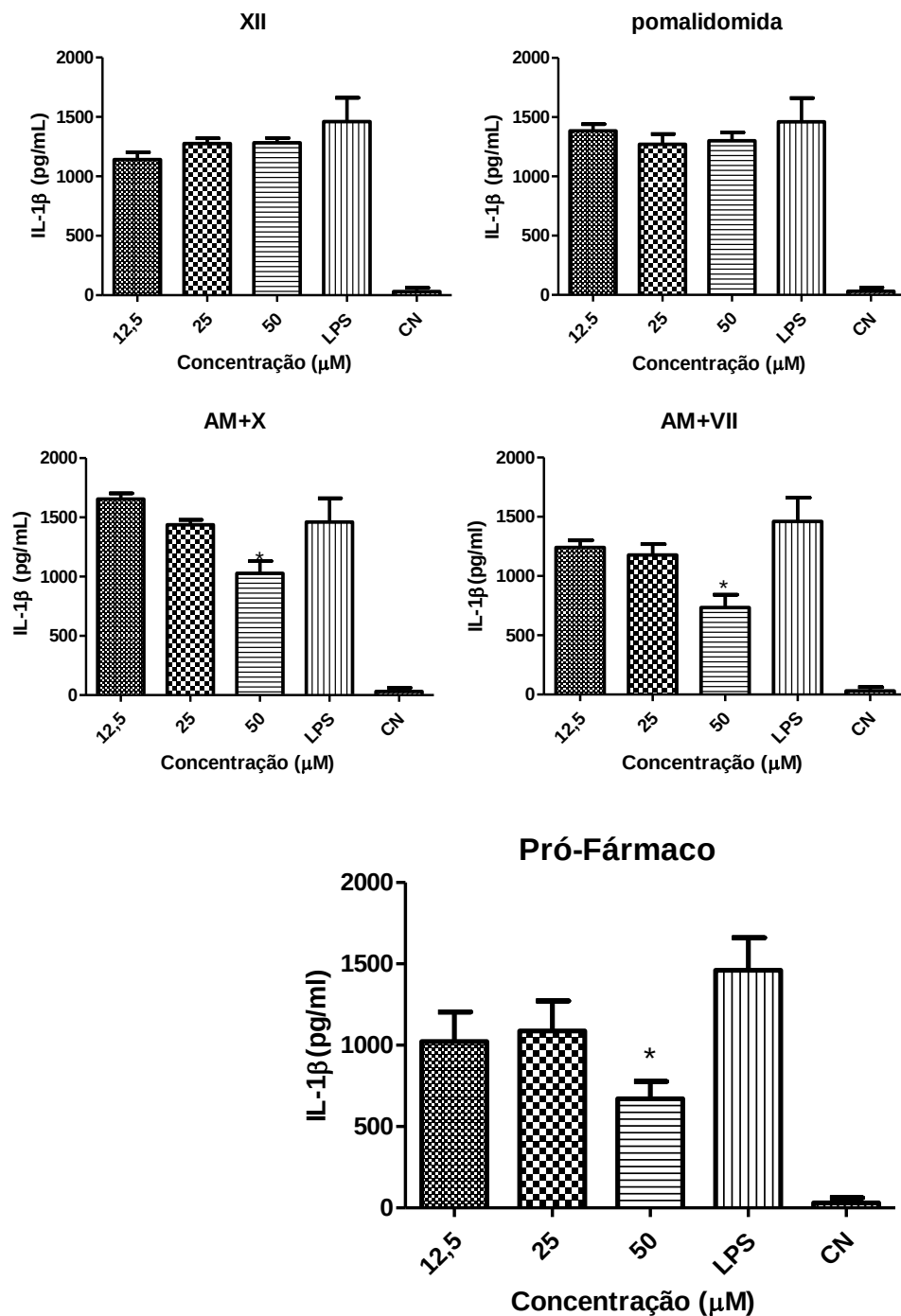
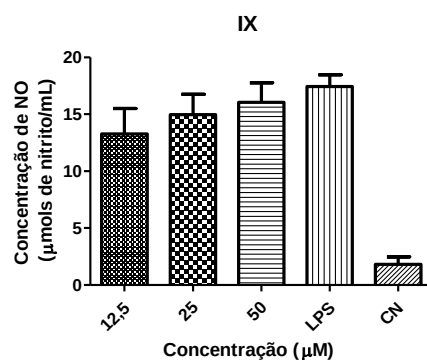
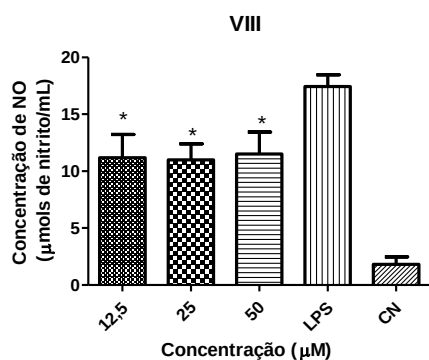
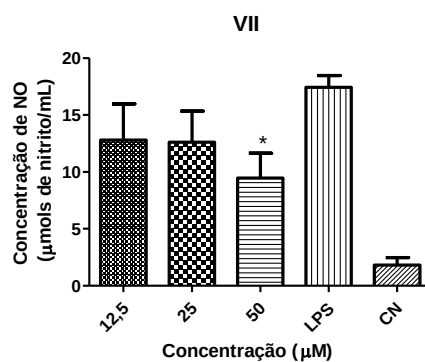
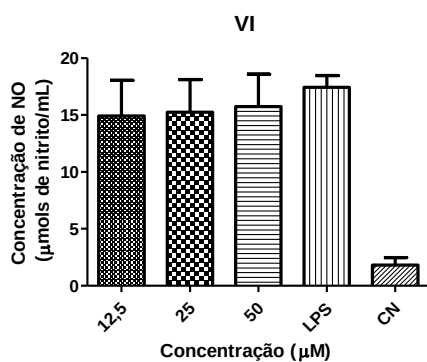
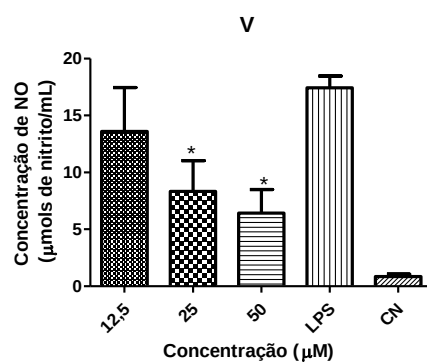
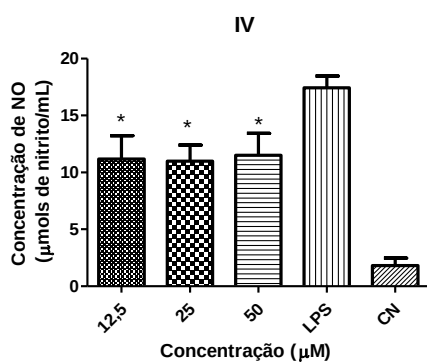
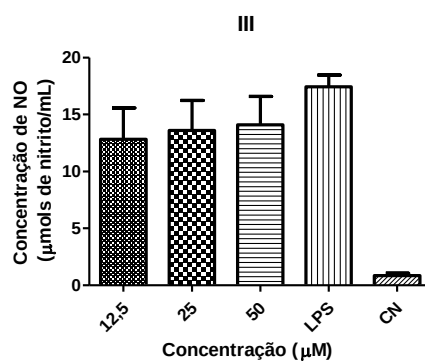
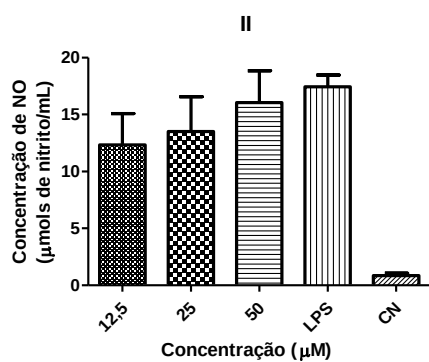


Figura 22. Quantificação de IL-1β liberado de macrófagos murinos incubados com os intermediários I-XII, AM, POM e do pró-fármaco em diferentes concentrações, e estimulados com LPS. As células em meio de cultura (RPMI-1640) sem estímulo com LPS foram utilizadas como controle negativo (CN). *, $p < 0.05$ comparado com LPS (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

5.2.1.1.3. Inibição da produção de NO

Os ensaios de inibição da produção de NO foram realizados nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M. Os resultados estão apresentados na Figura 23.



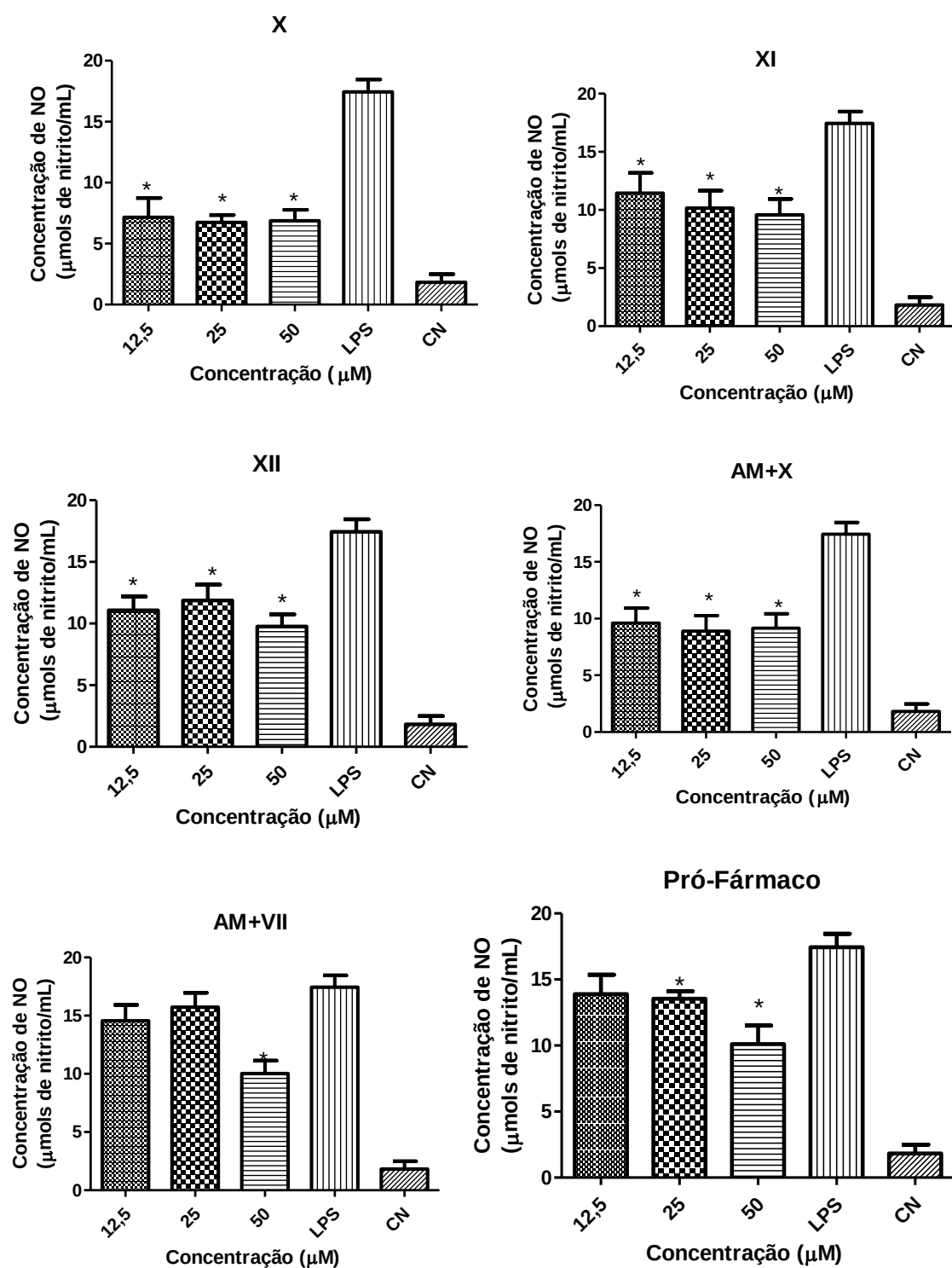


Figura 23.Quantificação de NO liberado de macrófagos murinos incubados com os intermediários I-XII, AM, POM e do pró-fármaco em diferentes concentrações, e

Resultados

estimulados com LPS. As células em meio de cultura (RPMI-1640) sem estímulo com LPS foram utilizadas como controle negativo (CN). *, $p < 0.05$ comparado com LPS (ANOVA seguido do teste de Dunnett).

6.3. Avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas e absorção intestinal dos intermediários e pró-fármaco.

A determinação preditiva das propriedades farmacocinéticas e da toxicidade foi determinada para os intermediários ftalimídicos I-XII. A identificação dessas propriedades pode ser úteis no planejamento dos pró-fármacos desejados. Embora, tenha sido identificado os intermediários X e VII como sendo os mais ativos, decidiu-se avaliar os demais devido a variação estrutural que a série apresenta e verificar se há diferenças significativas entre eles. O objetivo foi tentar compreender se há parâmetros importantes do ponto de vista molecular que também justifiquem a seleção destes compostos em comparação com os demais. Na Tabela 12 estão apresentados os descritores moleculares a fim de avaliar se os compostos apresentam os valores recomendados pela regra de Lipinski (LIPINSKI et al., 2001). A regra de Lipinski é um importante filtro usado na indústria farmacêutica que auxilia na identificação de propriedades adequadas dos compostos que visam se tornar um novo fármaco ativo por via oral.

Para este estudo calculou-se os parâmetros da regra de Lipinski, solubilidade em água dos intermediários e porcentagem de absorção intestinal (Tabela 12).

Resultados

Tabela 12. Comparação das propriedades físico-químicas e absorção intestinal dos compostos usando o programa pkCSM (<http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsml>) (PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

Intermediários	Log P	Aceptores	Doadores	Peso Molecular (Da)	Solubilidade em água (log mol/L)	% absorção intestinal
I	0.23	3	1	239,25	-2,10	76,75
II	1.95	3	1	253,25	-3,21	98,21
III	1.98	3	1	253,25	-3,21	98,21
IV	2.02	3	1	267,28	-3,38	98,59
V	1.98	3	1	253,25	-3,21	98,21
VI	0.14	5	1	222,15	-2,11	76,76
VII	1.89	5	1	298,25	-4,16	88,97
VIII	1.89	5	1	298,25	-4,16	88,97
IX	1.93	5	1	312,28	-4,30	88,18
X	1.56	4	2	267,28	-3,07	95,56
XI	1.89	5	1	267,28	-4,16	88,97
XII	1.56	4	2	282,29	-3,07	95,56
AM	3.03	5	2	320,34	-3,57	65,59
POM	-0.33	5	2	273,25	-2,34	72,27
AM+VII	5.07	9	2	600,13	-5,55	92,46

6. Discussão

6.1. Síntese dos Intermediários

As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) permitem observar o hidrogênio 5 presente na ftalimida (**5**) em 11,46 ppm (Figura 19). Este sinal está ausente no intermediário I, que apresenta como principais diferenças a presença do hidrogênio metilênico em 5,27 ppm integrando para 2 átomos de hidrogênio e a presença da hidroxila na posição 6 em 6,5 ppm integrando para 1 hidrogênio.

Para espectrofotometria na região do infravermelho observa-se para o derivado ftalimídico (**5**) a presença do N-H da função imida em 3201 cm^{-1} , o estiramento axial de C-H de aromático em 3051 cm^{-1} e as carbonilas do sistema imídico em 1778 e 1683 cm^{-1} (Figura 13). Para o intermediário I, as bandas de estiramento podem ser observadas em 3489 cm^{-1} referente ao estiramento axial da ligação O-H, estiramento axial de C-H de aromático em 3030 cm^{-1} e as carbonilas do sistema imídico em 1770 e 1705 cm^{-1} . Não é observada a função N-H presente na ftalimida, sugerindo a presença do composto desejado.

Do ponto de vista mecanismo (Figura 19), a reação de formação da ftalimida (**5**) trata-se de uma reação de condensação em que os pares de elétrons do nitrogênio da ureia atuando como nucleófilo ataca a carbonila sp^2 do anidrido ftálico. O anel de 5 membros tensionado do anidrido sofre abertura, e posteriormente o par de elétrons do nitrogênio da uréia ataca a carbonila do ácido carboxílico levando a formação do núcleo ftalimidico. Esta etapa é endergônica, ou seja, necessita de energia na forma de calor para que a reação ocorra e é muito semelhante na formação de todos os derivados ftalimidicos. Na última etapa do mecanismo reacional, o outro par de elétrons do nitrogênio da uréia estabelece uma ligação sp^2 levando a eliminação da ftalimida.

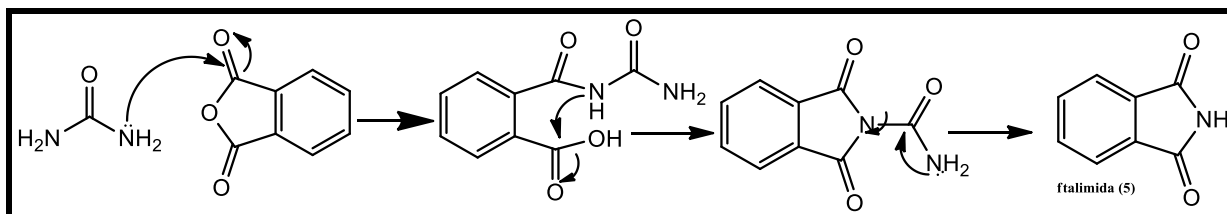
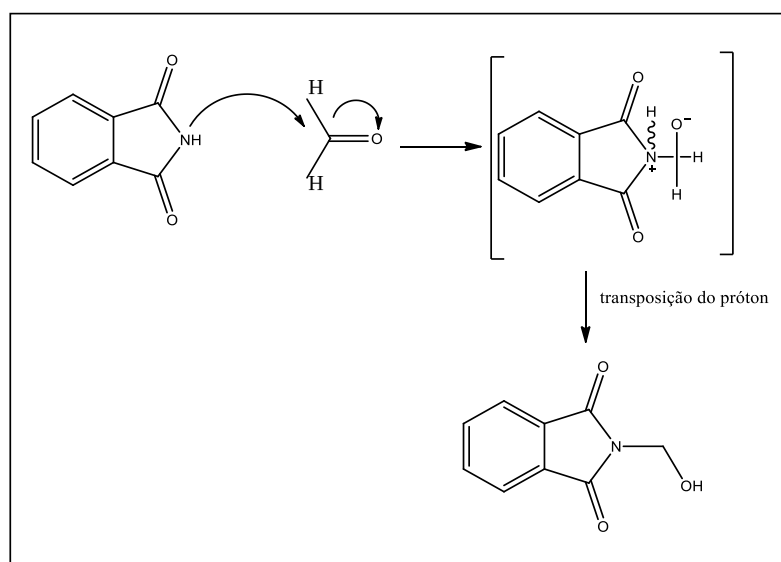


Figura 24. Mecanismo reacional para formação da fthalimida (5).

Para formação do intermediário I, a reação ocorreu através de uma reação de adição do nitrogênio ácido da fthalimida à carbonila do formaldeído. Inicialmente, o par de elétrons do nitrogênio da imida ataca o carbono da carbonila do formaldeído, ocorre o rompimento da ligação π (dupla) e posterior o deslocamento da carga negativa formada para o átomo de oxigênio. Há transposição interna de próton levando ao intermediário I, conforme representado na Figura 20.



(Fonte: próprio autor)

Figura 25. Mecanismo reacional para formação do intermediário I.

Para síntese dos intermediários II – XII o mecanismo reacional foi idêntico e envolveu a reação de condensação de uma aril-amina funcionalizada com anidrido ftálico (4). O solvente escolhido para obtenção desses intermediários foi a piridina, por ser um solvente básico não nucleofílico com elevado ponto de ebulição. A

Discussão

basicidade auxilia disponibilizando o par de elétrons da amina, tornando-a mais nucleofílica, facilitando o ataque à carbonila do anidrido ftálico, para posterior formação do intermediário desejado, e, o alto ponto de ebulição da piridina favorece a etapa de desidratação final levando ao fechamento do anel ftalimídico.

A reação inicia-se com o ataque nucleofílico do par de elétrons livre do nitrogênio da aril amina à carbonila do anidrido ftálico, que sustenta uma carga parcial positiva (δ^+). Há rompimento da ligação π , e o par de elétrons é deslocado para o átomo de oxigênio. Ao reestabelecer a ligação π , há quebra da ligação C-O do anidrido. O par de elétrons da amina ataca o carbono carbonílico localizado na posição orto aromática. Novamente, há rompimento de outra ligação π que ao ser reestabelecida elimina uma molécula de água, levando ao fechamento do anel e formando o derivado aril-ftalimídico funcionalizado. A título de exemplificação, a Figura 21 mostra o mecanismo para obtenção do intermediário II.

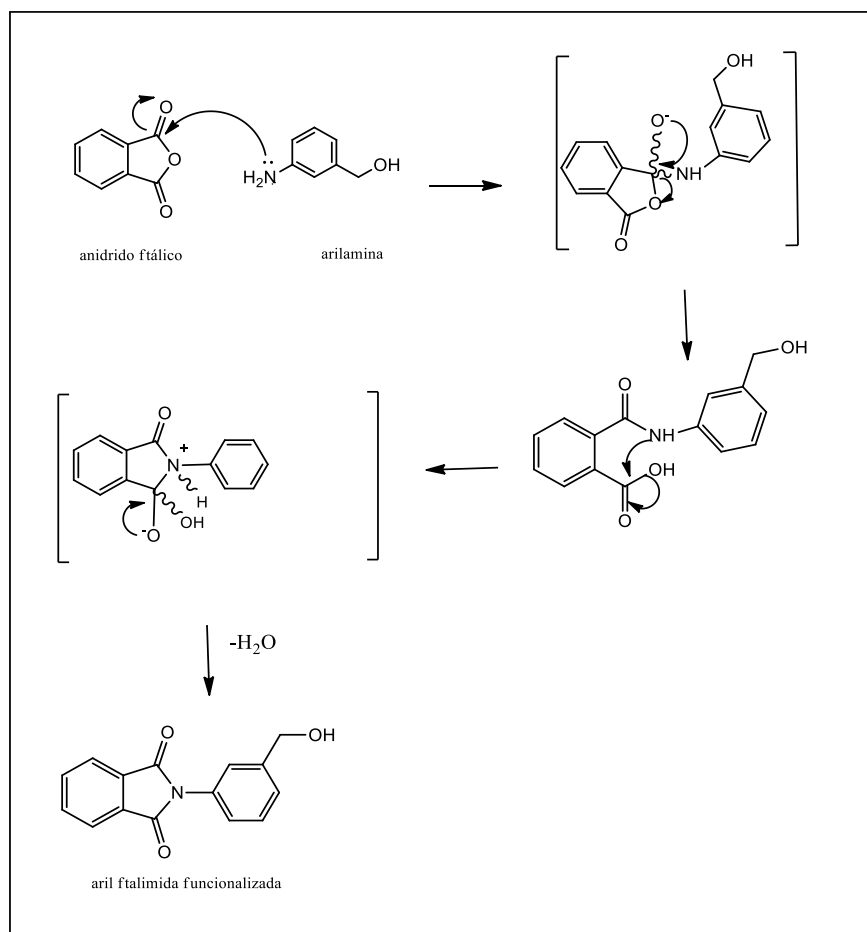


Figura 26. Mecanismo de formação dos derivados arilftalimídicos funcionalizados.

Os compostos foram purificados por cromatografia preparativa em coluna manual ou usando o equipamento Biotage. Os rendimentos obtidos, faixa de fusão e pesos moleculares dos compostos obtidos são descritos na Tabela 3.

Para obtenção dos derivados aminados (intermediários X-XII) o nitro-aromático foi reduzido na presença do metal ferro e cloreto de amônio como fonte de doação de hidrogênio. O mecanismo envolve uma reação de oxi-redução. A reação com os derivados aminados foi acompanhada com o revelador ninidrina, utilizado para revelar grupos amina primários livres.

De maneira geral para os espectros na região do infravermelho para todas as moléculas é possível observar os estiramentos axiais referentes a ligação O-H em aproximadamente 3530 cm^{-1} , a presença do estiramento axial C-H de

aromático em $\sim 3030\text{ cm}^{-1}$, as carbonilas do sistema imídico em ~ 1760 e 1710 cm^{-1} e os sistema C-N-C da imida em 1388 cm^{-1} .

De maneira geral para os espectros na ^1H RMN é possível observar os sinais dos sistemas aromáticos da ftalimida não substituídas como duplo-dupletos em 7,92 e 7,95 ppm. Para os hidrogênios da ftalimida contendo o grupo nitro ou amino observa-se os sinais dos hidrogênios compreendidos entre 7,27-7,52 ppm. O sistema aromático ligado a ftalimida aparece mais desprotegido nos derivados contendo o grupo nitro, devido ao efeito eletroatrator desse grupo; e de forma contrária, esses hidrogênios encontram-se mais protegidos nos derivados aminados – devido ao efeito doador de elétrons (mesomérico) do grupo amino. Os hidrogênios metilênicos da cadeia lateral apresentam-se como singletos em aproximadamente 4,57 ppm para os intermediários II, III, V, VII, VIII, X e XI. Para os intermediários IV, IX e XII observa-se os sinais de dois tripletos em aproximadamente 2,94 ppm e 3,91 ppm. Destaca-se ainda, a presença dos hidrogênios da amina aromática em 1,94 ppm para os compostos X-XII. O hidrogênio da hidroxila para todos os compostos aparece em aproximadamente 4,55 ppm. Em resumo, os dados analíticos sugerem a obtenção dos intermediários desejados.

6.2. Síntese do pró-fármaco

A partir da identificação das propriedades inibidoras de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e NO pelo intermediário X, porém devido à dificuldades durante a purificação do composto resultante desta reação, optou-se por utilizar o intermediário VII, partindo-se para a segunda etapa do planejamento que visava o acoplamento deste derivado com ácido micofenólico. Do ponto de vista mecanístico, esta reação trata-se da formação de um grupo éster e pode ser realizada utilizando como agente acoplante o 1,1'-Carbonildiimidazol(CDI) que libera um molécula de CO_2 durante a reação (Figura 20). O CDI é um agente acoplamento que é usado para a formação de amida, mas pode ser útil para a formação de de ésteres.

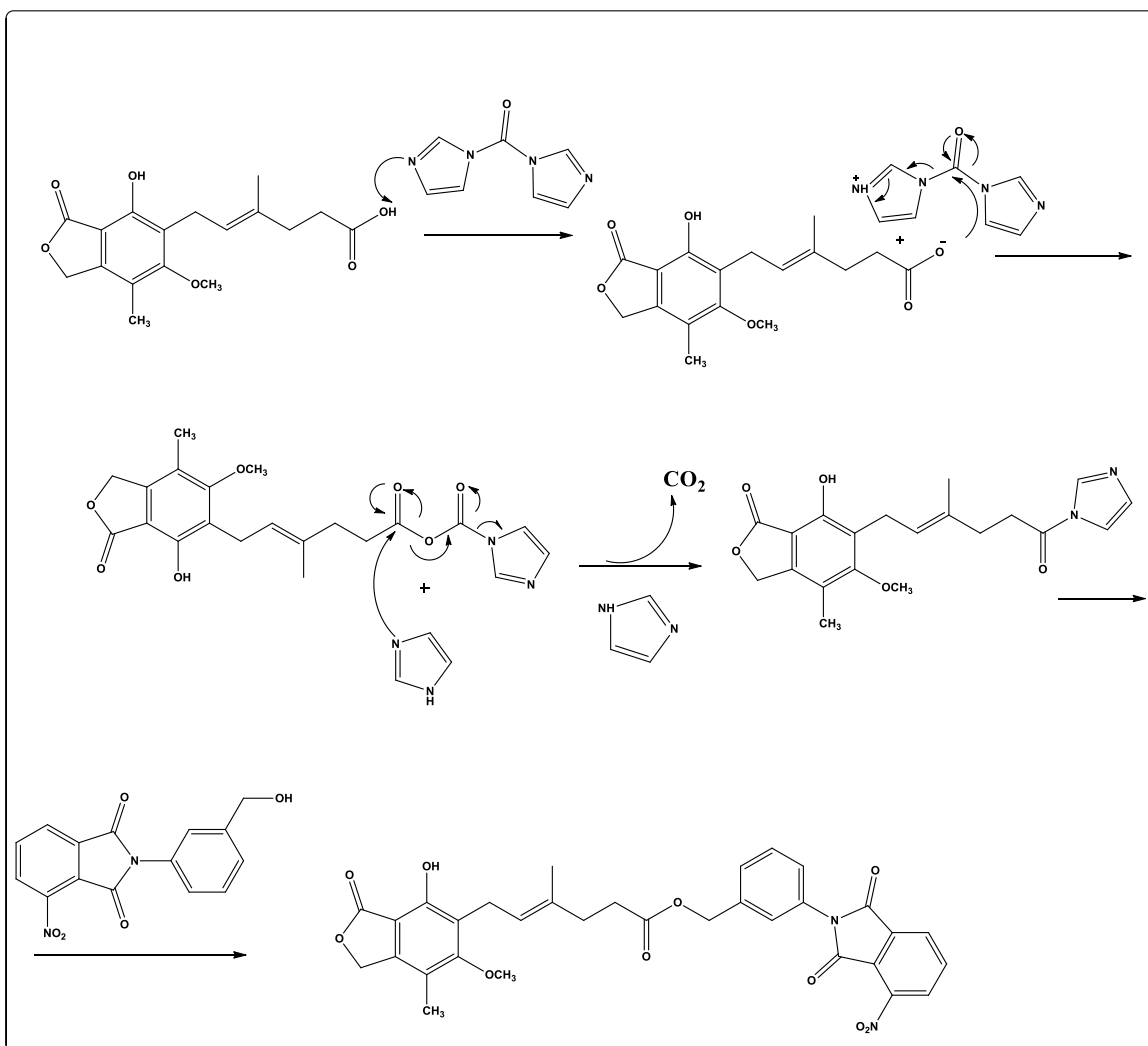


Figura 27: Mecanismo de formação do pró-fármaco.

A reação inicia-se com a desprotonação do ácido micofenólico através da ação do nitrogênio imídico do CDI, este íon oxigênio atua como nucleófilo, atacando a carbonila do sistema imídico do CDI, formando um intermediário. Este intermediário sofre o ataque dos elétrons livres do átomo de nitrogênio do composto imidazol que foi formado, havendo a liberação de uma molécula de gás carbônico (CO₂). O oxigênio da hidroxila livre da ftalimida atua como nucleófilo atacando a carbonilado ácido, formando o éster do ácido micofenólico.

Na caracterização do composto final utilizando a espectrofotometria na região do infravermelho observa-se a presença de C-N-C na região de 1357 cm⁻¹, o estiramento axial de C-H e a carbonila do sistema imídico na região de 1780 cm⁻¹, assim como a carbonila de éster nas regiões de 1610; 1715 e 1750 cm⁻¹,

observa-se também um estiramento na banda de 3445 cm^{-1} referente a hidroxila fenólica. A ligação C-C alquílica é observada na região de 2930 cm^{-1} , o grupamento NO_2 é observado no deslocamento axial de na região de 1357 cm^{-1} .

Analisando o espectro de RMN de ^1H observa-se o deslocamento na região de 8.15-8.24, referente aos hidrogênios do anel aromático ligado à metilhidroxila. O deslocamento na região de 2.08 com um singlete, indica os hidrogênios alquílicos ligados a metila aromática. Na região de 8.32-8.35 observa-se os hidrogênios do sistema ftalimídico. O singlete correspondente a 3 hidrogênios na região de 5.08 refere-se aos hidrogênios correspondentes ao grupamento metilênico derivado da metoxila do intermediário, e que pode comprovar a formação do éster, caracterizado pela ligação entre a hidroxila do álcool ftalimídico e o hidrogênio do ácido micofenólico.

6.3. Ensaio de viabilidade celular de macrófagos

A presença de infiltrados de macrófagos está associada com o diagnóstico de rejeição aguda em transplantes renais. Os macrófagos contribuem diretamente para o dano tecidual durante a rejeição aguda de um transplante de um órgão vascularizado (KANNEGIETER, 2016). Por isso, fármacos que inibem seu crescimento ou moderam a liberação de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ podem ser promissores para evitar a rejeição.

Estudos demonstram que o AM inibe a proliferação de monócitos assim como mantém seu ciclo celular na fase S aumentando sua morte por apoptose (COHN et al, 1999).

O composto I demonstrou ser o mais citotóxicos de todas da série de intermediários ftalimídicos com valores de viabilidade variando na faixa de 49% a 57% em todas as concentrações. Devido a este comportamento frente aos macrófagos, para este composto não foram realizados os ensaios de inibição das citocinas: $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$.

Os compostos II, III,V, VII, VIII, X e XII apresentaram-se com citotoxicidade muito baixas e viabilidades celulares próximas a 100. Este mesmo padrão foi observado para o ácido micofenólico, usado como controle.

O composto X apresentou viabilidades de 80% e 45,5%, nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M, respectivamente. Os dados obtidos permitiram a determinação dos valores de concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}) deste composto como sendo 186 μ M.

A pomalidomida outro fármaco utilizado como padrão mostrou-se muito citotóxico nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M. Nestas concentrações os valores de viabilidade foram de 31,7% e 4,7%, respectivamente.

A associação física do intermediário X e do ácido micofenólico mostrou um comportamento semelhante ao comportamento do X sozinho, nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M. Apesar disso, essa associação apresentou viabilidade menor de 65% e 44% nestas concentrações, respectivamente.

O éster não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, enquanto que a associação física do ácido micofenólico e do composto VII apresentou citotoxicidade significativa em todas as concentrações testadas que variou de 32 a 48%, esta associação mostrou-se muito citotóxica comparada a outros compostos testados.

Assim, através desses resultados de viabilidade celular, foi possível determinar as concentrações a serem utilizadas no teste para determinação da inibição das citocinas TNF- α , IL-1 β e dosagem de NO no sobrenadante das culturas de macrófagos. A viabilidade foi superior a 75% para todos os compostos em concentrações de 50 μ M ou inferiores, exceto para o composto I.

6.4. Quantificação de TNF- α e IL-1 β em macrófagos murinos

Macrófagos podem contribuir para a rejeição em transplantes e em danos teciduais através de vários mecanismos potenciais: 1) iniciando a resposta imune através da apresentação de antígenos para os linfócitos; 2) promovendo a resposta inflamatória através do aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α ; 3) causando dano tecidual diretamente através da liberação de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (JOSÉ et al, 2003). Devido a esta importância das citocinas pró-inflamatórias, optamos por avaliar a ação destes intermediários sobre TNF- α e IL-1 β .

O intermediário VII apresentou inibição significativa de IL-1 β na concentração de 50 μ M e 12,5 μ M (32% e 23%, respectivamente). O intermediário X também apresentou inibição significativa nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M (28% e 35%). Os outros intermediários e a POM não apresentaram inibição significativa em nenhuma das concentrações avaliadas.

A associação física entre o ácido micofenólico e o intermediário X apresentou inibição significativa da liberação de IL-1 β em relação ao controle positivo (LPS), apenas na concentração de 50 μ M. A associação do ácido com o intermediário VII não resultou em inibição da produção de TNF- α em nenhuma concentração testada, mas inibiu a produção de IL-1 β na concentração de 50 μ M.

Observa-se que a inibição para o TNF- α foi maior nas três concentrações avaliadas para o intermediário X, com inibições menores para a IL-1 β . As porcentagens de inibição de liberação de TNF- α foram: 57,1%, 56,1% e 65,8%, nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M, respectivamente. As porcentagens de inibição de liberação de IL-1 β para o composto foram: 19,5%, 34,5% e 41,2 nas concentrações de 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M, respectivamente.

O pró-fármaco sintetizado e testado foi capaz de inibir a concentração de ambas as citocinas TNF- α nas concentrações 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M, (13%; 19% e 30%) e a produção de IL-1 β foi inibida em 55% na concentração de 50 μ M.

A citocinas IL-1 β e o TNF- α consideradas citocinas pró-inflamatórias estão particularmente envolvidas na fase aguda da resposta imune e promovem a diferenciação de linfócitos em Th1 (PATELLA, 2015), contribuem de maneira significativa na regulação da resposta imune.

Em vários estudos demonstraram-se que o AM reduziu a liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Em concentrações de 10 μ M, o ácido micofenólico foi capaz de inibir significativamente a produção de TNF- α (INGEBORG, 1997). Anteriormente avaliado no nosso laboratório, observou-se que o ácido micofenólico inibiu de forma significativa a liberação in vitro de TNF- α nas concentrações de 25; 12,5 e 6,25 μ M (BARBIERI, 2014).

Em resumo, ambos ensaios de quantificação de citocinas (TNF- α e IL-1 β) demonstraram que o intermediário X é o mais ativo na modulação destas citocinas

pró-inflamatórias. O pró-fármaco se mostrou promissor para a inibição de liberação das citocinas na maior concentração testada.

6.5. Inibição da Produção de óxido nítrico

Uma das principais causas de mau funcionamento do enxerto é a lesão de isquemia-reperfusão afetando negativamente a sobrevida do paciente após o transplante (LEMASTERS, 1995).

As alterações hemodinâmicas que ocorrem após a reperfusão do enxerto e as complicações específicas deste fato podem ser resultado da presença do óxido nítrico (ZI-QING et al., 2006).

O NO é uma molécula imunomoduladora que foi proposta como importante mediador da rejeição aguda em aloenxertos (VIJAY, 2003). A correlação entre os níveis de NO e a rejeição pode indicar a atividade imunológica do organismo do receptor, ou seja, o aumento dos níveis séricos de NO sinaliza rejeição em transplantes de fígado (KUO et al., 1996).

Os compostos foram testados nas concentrações de 50; 25 e 12,5 μ M e observou-se que muitos foram capazes de inibir a liberação de óxido nítrico. Os compostos IV, V, VII, VIII, X e XI, além disso as associações físicas entre o ácido micofenólico e os compostos VII e X inibiram a liberação de NO pelos macrófagos, o composto final foi capaz de inibir a liberação de NO nas concentrações de 50 e 12,5 μ M.

O pró-fármaco inibiu a produção de NO, nas concentrações de 50 e 12,5 μ M, de 70 e 58%, respectivamente.

Compostos capazes de inibir a produção de NO no local do transplante podem contribuir para a prevenção da rejeição do órgão transplantado, contribuindo para aumentar o sucesso clínico do procedimento.

Observa-se nos resultados obtidos que há correlação na inibição de TNF- α , IL-1 β e NO entre os compostos avaliados, ou seja, compostos que inibiram de forma significativa a produção de TNF- α consequentemente inibiram a produção de IL-1 β e NO.

Esta observação corrobora com a literatura, pois a produção de NO é influenciada pela produção de TNF- α e IL-1 β , ou seja, a inibição das citocinas

deve inibir também a síntese de NO. Porque a produção de NO ocorre pela expressão da óxido nítrico sintase inducível (iNOS) (BAKKER et al., 2009). A expressão do gene da iNOS é regulada por mecanismos complexos que envolvem várias citocinas como IL-1 β e TNF- α

6.6. Avaliação *in silico* das propriedades físico-químicas e absorção intestinal dos intermediários e do pró-fármaco.

Segundo dados da Tabela 10 podemos inferir que os intermediários apresentam características adequadas para absorção oral e que estes obedecem os parâmetros recomendados pela regra de Lipinski. Essa regra estabelece que os compostos devem possuir: a) peso molécula inferior a 500 Da; b) valores de logP inferior a 5; c) não mais que 5 doadores de hidrogênio; d) não mais que 10 aceptores de hidrogênio (LIPINSKI et al., 2001).

Devido a baixa biodisponibilidade oral do ácido micofenólico, a inserção de transportadores com alta lipossolubilidade é um fator importante para garantir melhorias nas propriedades farmacocinéticas dos compostos. Para o fármaco ativo por via oral, micofenolato de mofetila, o grupo mofetila contribui com melhorias nos parâmetros farmacocinéticos. Por isso, este estudo *in silico* se justifica para avaliar a contribuição dos intermediários ftalimilídicos que serão usados no pró-fármaco.

Quanto a lipossolubilidade, avaliada pelo logP, verificou-se que os compostos apresentaram valores que variaram entre 0,14 e 2,02. Para os regioisômeros são observados mesmos valores de logP. O intermediário X apresentou logP calculado de 1,56. Este resultado permite inferir que este intermediário contribuirá com incremento de lipossolubilidade no pró-fármaco desejado. Neste cálculo, os valores de logP são determinados pelo método de fragmentação, em que cada subunidade ou grupo funcional é somado individualmente na contribuição final da molécula.

Para os dados de absorção intestinal, o programa usa um modelo matemático denominado gráfico de assinaturas. Este consiste em combinar dados

depositados em bancos de dados relativos a absorção de compostos orgânicos e avaliar de maneira somatória o que a contribuição individual dos grupos poderia proporcionar a molécula final. Segundo PIREs e colaboradores – autores deste estudo – os resultados de absorção apresentam boa correlação com dados experimentais. No estudo experimental, considera-se o ensaio de absorção usando células Caco-2.

As células Caco-2 é composto de células humanas epiteliais de adenocarcinoma coloretal cuja células em monocamada são amplamente utilizadas *in vitro* como modelo de mucosa intestinal humana para prever absorção de fármacos. O modelo do programa pkCSM foi construído utilizando dados experimentais de 674 compostos ensaiados em células Caco-2 e esta expresso no logaritmo de permeabilidade aparente ($\log P_{app}$; $\log \text{ cm/s}$). O composto é considerado apresentar alta permeabilidade em células Caco-2 se P_{app} for maior que $8 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$. Para o modelo preditivo alta permeabilidade em Caco-2 é considerado para valores de predição superiores a 0.90. A partir desses dados, estima-se a absorção intestinal dos compostos. É considerado pobre ou baixa absorção valores iguais ou inferiores a 30%. Nos cálculos deste estudo, foi identificado que os intermediários I-XII apresentaram valores de absorção entre 76,75% e 98,59%.

A solubilidade em água é um dos parâmetros determinantes para atividade biológica dos compostos. O modelo do programa pkCSM possui capacidade preditiva da solubilidade em água de compostos orgânicos. Este foi construído utilizando dados experimentais de banco de dados de 1708 compostos. No estudo, verificou-se que a solubilidade em água expressa como logaritmo da concentração molar ($\log \text{ mol/L}$) variou de -2,10 a -4,30 $\log \text{ mol/L}$. Para o intermediário X observa-se que a solubilidade foi de -3,07 $\log \text{ mol/L}$, superior ao intermediário II cujo valor foi de -3,21 $\log \text{ mol/L}$. Destaca-se ainda, que o intermediário X possui um grupo aril-amina primário que possui $P_{ka} \sim 11,5$, ou seja, é um grupo básico que deve estar protonado em pH plasmático (pH7,4) aumentando ainda mais a solubilidade deste intermediário comparado ao intermediário II – não substituído.

Outros dados identificados no estudo *in silico* apontam que todos os intermediários são substratos da glicoproteína P, envolvida no processo de absorção de fármacos. Além disso, a atividade de ser substrato ou inibidor das enzimas hepáticas do citocromo 450 também foi avaliada. Os compostos II, III, IV, V, VII, VIII, X, XI, XII e XIII apresentam atividade de inibidores da isoforma CYP1A2. Apenas o composto IX mostrou-se substrato da isoforma CYP 3A4. Os compostos I e VI não mostram atividade em nenhuma isoforma do citocromo CYP 450. Os intermediários não são ainda substratos do transportador OCT2 renal.

7. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo permitem concluir que:

- ✓ Foram sintetizados 12 intermediários ftalimídicos, com rendimentos de 45-93%;
- ✓ O intermediário I foi o mais citotóxico da série com valores de viabilidade entre 49% e 57% nas concentrações utilizadas;
- ✓ Os intermediários II, III, V, VII, VIII, XI apresentaram-se com viabilidades celulares próximas a 100%, em todas as concentrações testadas;
- ✓ O composto X apresentou viabilidades de 80% e 45,5%, nas concentrações de 100 μ M e 200 μ M, respectivamente;
- ✓ Os compostos mais ativos para a inibição de TNF- α são os compostos V e X;
- ✓ A associação entre o intermediário X e o ácido micofenólico não demonstrou inibição significativa da produção de TNF- α nas concentrações testadas;
- ✓ O intermediário VII apresentou inibição significativa de IL-1 β na concentração de 50 μ M. Já o intermediário X apresentou inibição significativa nas concentrações de 25 μ M e 50 μ M;
- ✓ A associação entre o ácido micofenólico e o intermediário X apresentou inibição significativa da liberação de IL-1 β na concentração de 50 μ M.;
- ✓ Embora o intermediário mais promissor nos testes biológicos foi o X optou-se pela escolha do intermediário VII para o acoplamento com o

Referências Bibliográficas

ácido micofenólico e a síntese do pró-fármaco, devido as dificuldades sintéticas encontradas;

- ✓ A reação de acoplamento para síntese do pró-fármaco, obteve-se um rendimento de 19%;
- ✓ O pró-fármaco apresentou viabilidade celular que variou 96-100%, apresentou inibição significativa de IL-1 β e NO nas três concentrações testadas;
- ✓ O pró-fármaco inibiu a produção de TNF- α apenas na concentração de 50 μ M
- ✓ Observou-se uma correlação nas atividades de inibição de TNF- α , IL-1 β e NO dentre os compostos avaliados;
- ✓ Estudos *in silico* sugerem que o pró-fármaco planejado possui propriedades físico-químicas que poderiam contribuir para o aumento da permeabilidade comparados ao ácido micofenólico.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Elaborado de acordo com a norma NBR 6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

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

ADAMS, A.B.; PEARSON, T.C.; LARSEN, C.P. Heterologous immunity: an overlooked barrier to tolerance. *Immunology Review*, v. 196, p.147-160, 2003.

AKOBENG, A.K.; STOKKERS, P.C. Thalidomide and thalidomide analogues for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database System Review*, 2009.

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

ALLISON, A. C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology*, v. 47, p.63-83, 2000.

ALLISON, T.L. Immunosuppressive Therapy in Transplantation. *Nursing Clinics of North American*, v.51, n.1, p.107-120, 2016.

ALMQUIST, E.E.; NECKING, L.; BACH, A.W. Epicondylar resection with anconeus muscle transfer for chronic lateral epicondylitis. *The Journal of Hand Surgery*, v.23, n.4, p.723-731, 1998.

ALSBERG, C.L.; BLACK, O.F. Contribution to the Study of Maize Deterioration. *US Department of Agriculture, Bureau of Plant Industry*, v.270, p.7-48, 1913.

Referências Bibliográficas

ANGERS S. et al. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature*, v. 413, n. 7111, p. 590-593, 2006.

BACAL, F. I. et al. I Guidelines of the Brazilian Cardiology Society for Heart Transplantation: IV. Rejection. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 73, Suppl 5, p. 21-26, 1999.

BARAN, D.A.; GALIN, I.D.; GASS, A.L. Current practices: immunosuppression induction, maintenance, and rejection regimens in contemporary post-heart transplant patient treatment. *Current Opinion Cardiology*, v.17, p.165–170, 2002.

BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. *Química Nova*, v.25, n.6B, p.1172-1180, 2002.

BEAUMONT, K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Current Drug Metabolism*, v. 4, n.6, p.461-485 2003.

BENICHO, G.; VALUJSKIKH, A.; HEERGER, P.S. Contributions of direct and indirect Tcell alloreactivity during allograft rejection in mice. *Journal Immunology*, v.162, n.1, p.352-368, 1999.

BIRCH, A. J.; WRIGHT, J.J. A Total Synthesis of Mycophenolic Acid. *Australian Journal Chemistry*, v. 22, p. 2635-2644, 1969.

BIRKINSHAW, J.H.; RAISTRICK, H.; ROSS, D.J. Studies in the biochemistry of micro-organisms. The molecular constitution of mycophenolic acid, a metabolic product of *Penicillium Brevicompactum* Dierckx. Part III. Further observations on

Referências Bibliográficas

the structural formula for mycophenolic acid. *Biochemical Journal*, v. 50, n. 5, p. 630-634, 1952.

CALABRESE, L.; FLEISHER, A. B. Thalidomide: current and potential clinical applications. *American Journal of Medicinal*, v.108, n.6, p. 487-495, 2000.

CARR, S.F. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *Journal Biology Chemistry*, v.268, n.36, p.27286-27290, 1993.

CHAMBERLAIN, P.P. Structure of the human Cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. *Nature Structure Molecular Biology*, v.21, n.9, 803-809, 2014.

CHANG, X. Mechanism of immunomodulatory drugs' action in the treatment of multiple myeloma. *Acta Biochimica Biophysica Sinica*, v.46, n.3, p. 240-253, 2014.

CATTANEO, D.; BALDELLI, S.; PERICO, N. Pharmacogenetics of immunosuppressants: progress, pitfalls and promises. *American Journal Transplant*, v.8, n.7, p.1374-1383, 2008.

CHOLEWINSKI, G.; MALACHOWSKA-UGARTE, M.; DZIERZBICKA, K. The Chemistry of Mycophenolic Acid – Synthesis and Modifications Towards Desired Biological Activity. *Current Medicinal Chemistry*, v.17, p.1926-1941, 2010.

CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. O processo da latenciação no planejamento de fármacos. *Química Nova*, v.22, p.75-84,1999.

CHUNG, M.C. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n.2, p. 155-179, 2005.

Referências Bibliográficas

COHN, R.G. Mycophenolic acid increases apoptosis, lysosomes and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines. *Transplantation*, v.68, n.3, p.411-418, 1999.

DAHAN, A.; ZIMMERMANN, E.M.; BEN-SHABAT, S. Modern prodrug design for targeted oral drug delivery. *Molecules*, v. 19, n.10, p.16489-16505, 2014.

DAVIES, F.E. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, v.98, p.210-216, 2001.

DE SANCTIS, J.B. Pharmacological Properties of Thalidomide and its Analogues. *Recent Patents Inflammation Allergy Drug Discovery*, v. 4, n. 2, p.1-5, 2000.

DIGGLE, G.E. Thalidomide: 40 years on. *International Journal Clinical Practice*, v.55, p.627-631, 2001.

DOS SANTOS, J.L. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. *Journal Medicinal Chemistry*, v.54, n.16, p.5811-5819, 2011.

DOS SANTOS, J.L. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. part II: furoxan derivatives. *Journal Medicinal Chemistry*, v.55,n.17,p.7583-7532, 2012.

DREDGE, K. Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. *British Journal Cancer*, v.87, n.10, p.1166-1172, 2002.

Referências Bibliográficas

ETTMAYER, P. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *Journal Medicinal Chemistry*, v.47, n.10, p.2393-2404, 2004.

FASINU, P. Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, v. 32, n.4, p.185-209, 2011.

FAIRWEATHER, L. Autoimmune Disease: Mechanisms. *Life Science*. Disponível em: <http://www.els.net>. 2007. Acesso em: 14/06/2017.

FRYMOYER, A. Population pharmacokinetics of unbound mycophenolic acid in adult allogeneic hematopoietic cell transplantation: effect of pharmacogenetic factors. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.75, n.2, p.763-775, 2013.

FURNISS, B. S. Vogel's textbook of practical organic chemistry. 5th. ed. Essex, England: Longman Scientific & Technical, 1991.1276p.

GOLDBERG, A.C.; RIZZO, L.V. Estrutura do MHC e função-apresentação de antígenos. Parte 1. *Einstein*, v. 13, n.1, p. 153-156, 2014.

HACKER, M.; WILLIAM S. MESSER II, KENNETH A. BACHMANN, K.A. *Pharmacology: Principles and Practice*. 1st. ed. San Diego, CA: Academic Press, 2009, 216-217.

HARTONO, C.; MUTHUKUMAR, T.; SUTHANTHIRAN, M. Immunosuppressive Drug Therapy. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine*, v.3, n.9, 2013.

Referências Bibliográficas

HE, G.; MASSARELLA, J.; WARD, P. Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. *Clinical Pharmacokinetics*, v.37, n.6, p.471-484, 1999.

HOFFSTETTER, T.B. Reduction of Nitro aromatic Compounds by Fe(II) Species Associated with Iron-Rich Smectites. *Environmental Science and Technology*, v.40, p.235-242, 2006.

HOLAN, V.; KRULOVA, M. Common and small molecules as the ultimate regulatory and effector mediators of antigen-specific transplantation reactions. *World Journal Transplant*, v.3, n.4, p.54-61, 2013.

HOOD, K.A.; ZAREMSKI, D.G. Mycophenolate mofetil: a unique immunosuppressive agent. *American Journal Health System Pharm*, v.53, n.3, p.285-294, 1997.

HRICIK, D. Transplant immunology and immunosuppression. *American Journal Kidney Discovery*, v.65, n.6, p.956-966, 2015.

HUTTUNEN, K.M.; RAUNIO, H.; RAUTIO, J. Prodrugs: from serendipity to rational design. *Pharmacological Reviews*, v.63, n.3, p.750-771, 2011.

JANG, M.Y. Discovery of 7-N-piperazinylthiazolo[5,4-d]pyrimidine analogues as a novel class of immunosuppressive agents with in vivo biological activity. *Journal Medicinal Chemistry*, v. 54, n.2, p. 655-668, 2011.

JOGLEKAR, S.; LEVIN, M. The Promise of Thalidomide: Evolving Indications. *Drugs Today*, v.40, n.3, p.197-204, 2004.

Referências Bibliográficas

JONES, E.L. Tratament of Psoriasis with oral mycophenolic acid. *Journal Investigation Dermatology*, v.7, n.9, p.537-542, 1975.

KANNEGIETER, N.M. The Effect Tacrolimus and Mycophenolic Acid on CD14+Monocyte Activation and Functions. *Plos One*, v.12, n.1, e0170806, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170806>.

KARPAGAVALLI, L. A Review on prodrugs. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, v.6, n.1, p. 1-5, 2016.

KIM, J.H.; SCIALLI, A.R. Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease. *Toxicological Sciences*, v.122, n.1, p.1-6, 2011.

KIM, H. Population pharmacokinetics of unbound mycophenolic acid in pediatric and young adult patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Journal Clinical Pharmacology*, v.52, n.11, p.1665-1675, 2012.

KLAUSEN, J. Reduction of Substituted Nitrobenzene by Fe(II) in Aqueous Mineral Suspensions. *Environmental Science and Technology*, v. 29, p. 2396-2404, 1995.

KOVARIK, J. From immunosuppression to immunomodulation: current principles and future strategies. *Pathobiology*, n. 80, v. 6, p.275-281, 2013.

KUO, P.C.; ALFREY, E. J.; ABE, K.; HUIE, P.; SIBLEY, R.K.; DAFOE, D.C. Cellular localization & effect of nitric oxide synthesis in a rat model of orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. V.6, p. 305–312, 1996.

Referências Bibliográficas

LECHLER, R. I. Organ transplantation-how much of the promise has been realized? *Nature Medicine*, v.11, n.6, p. 605-613, 2005.

LENZ, W.; KNAPP K. Thalidomide embryopathy. *Dtsch Medicine Wochenschr*, v.87,p.1232–1242, 1962.

LIBBY, P.; POBER, J.S. Chronic rejection. *Immunity*, v.14, n.4, p.387-397, 2001.

LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. O renascimento de um fármaco: talidomida. *Química Nova*, v.24, n.5, p.683-688, 2001.

LIMA, L.M. Synthesis and anti-inflammatory activity of phthalimide derivatives, designed as new thalidomide analogues. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, v.10, p. 3067-3073, 2002.

LIMA, L.M.; BARREIRO, E.J. Bioisosterism, an Useful strategy for molecular modification and Drug Design. *Current Medicinal Chemistry*, v. 11, p.1345-1359, 2004.

LINDNER, S.; KRÖNKE, J. The molecular mechanism of thalidomide analogs in hematologic malignancies. *Journal of Molecular Medicine*, v. 94, n. 12, p. 1327-1334, 2016.

LIPINSKI, C.A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advance Drug Delivery Review*, v. 46, n.1-3, p. 3–26, 2001.

Referências Bibliográficas

LIU, Y. A novel effect of thalidomide and its analogs: suppression of cereblon ubiquitination enhances ubiquitin ligase function. *FASEB Journal*, v.29, 12, p. 4829-4839, 2015.

MACHADO, A.L. Design, synthesis and anti-inflammatory activity of novel Phthalimide derivatives, structurally related to thalidomide. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letter*, v.15, n.4, p.1169-1172, 2005.

MAES, B.D. Mycophenolate mofetil in IgA nephropathy: Results of a 3-year prospective placebo controlled randomized study. *Kidney International*, v.65, n.5, p.1842-1849, 2004.

MANO, E. B.; SEABRA, A. Práticas de Química Orgânica, 3^a ed. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2002. p.206.

MARINO, J.; PASTER, J.; BENICHO, G. Allo Recognition by T Lymphocytes and Allograft Rejection. *Frontiers in Immunology*, v.7, Article ID 582, 2016. Disponível em: <http://www.frontiersin.org>. Acesso em: 01/06/2017.

MATTHEWS, S.J.; McCOY, C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. *Clinical Therapy*, n.25, v.2, p.342-395, 2003.

MCBRIDE, W.G. Thalidomide and Congenital abnormalities. *Lancet*, v. 2, p.1358, 1961.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunology Methods*. v.65, p. 55-63, 1983.

Referências Bibliográficas

MULLER, G.W. Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. *Journal Medicinal Chemistry*, v.39, p. 3238-3240, 1996.

MULLER G.W. Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF-alpha production. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letter*, v. 9, n.11, p. 1625-1630, 1999.

NASA, P.; PHOUGAT, P. Prodrug: A Novel Approach of Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v.25, n.1, p.188-191, 2014.

NEWMAN, P.J. Platelet alloantigens: cardiovascular as well as immunological risk factors? *Lancet*, v.349, p.370-371, 1997.

NORONHA, I. L. Micofenolato mofetil (MMF) em transplante de Órgãos. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v.19, n.4, p. 398-406,1997.

OTTO, C.; ULRICHS, K. The Immunology of Allograft Rejection: A Survey of Current Knowledge and a Discussion of Peptide-Specific Anti-Rejection Strategies. *Transplantationsmedizin*, S.158,2004. Disponível: <<http://www.transplantation.de>>. Acesso em: 13/06/2017.

PARISE-FILHO, R. Prodrugs available on the Brazilian pharmaceutical market and their corresponding bioactivation pathways. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.46, n.3, p.393-420, 2010.

Referências Bibliográficas

PERSSON, G. One month treatment with the once daily oral beta 2-agonist bambuterol in asthmatic patients. *European Respiratory Journal*, v.8, n.1, p.34-39, 1995.

PIRES, D.E.; BLUNDELL, T.L.; ASCHER, D.B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal Medicinal Chemistry*, v.58, n.9, p.4066-4072, 2015.

QUACH, H. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma, *Leukemic*, v. 24, n.1, p. 22-32, 2009.

RAHMAN, A.N.; TETT, S.E.; STAATZ, C.E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in patients with autoimmune disease. *Clinical Pharmacokinetics*, v.52, n.5, p.303-331, 2013.

RAUTIO, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews Drugs Discovery*, v. 7, n.3, p.255-270, 2008.

REGUEIRA, T.B. Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Application Environmental Microbiology*, v.77, n. 9, p.3035-3043, 2011.

ROGERS, N.J.; LECHLER, R.L. Allo Recognition. *American Journal of Transplant*, v. 1, n. 2, p.97-102, 2001.

SANTOS, J.L. *Síntese e avaliação farmacológica de protótipos candidatos a fármacos para o tratamento dos sintomas da anemia falciforme*. 129p. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2009.

Referências Bibliográficas

SANTOS, J. L. Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Hybrid Compounds to Treat Sickle Cell Disease Symptoms. *Journal Medicinal Chemistry*, v. 54, p. 5811-5819, 2011.

SCHAFER, P.H. Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutic*, v. 305, p.1222-1232, 2003.

SCHEY, S. A. Phase I study of an immunomodulatory thalidomide analog, CC-4047, in relapsed or refractory multiple myeloma. *Journal Clinical Oncology*, v.22, p. 3269–3276, 2004.

SHORTT, J.; HSU, A.K.; JOHNSTONE, R.W. Thalidomide-analogue biology: immunological, molecular and epigenetic targets in cancer therapy. *Oncogene*, v. 32, p. 4191– 4202, 2013.

SINGH, G.; SHARMA, P.D. Mutual prodrugs – a recent trend in prodrug design. *Indian Journal Pharmaceutical Science*. v.56, n.3, p.69-79,1994.

SINTCHAK, M.D.; NIMMESGERN, E. The structure of inosine monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors.v.47, n.2-3, p.163-184, 2000.

SLOAN, K. B.; WASDO, S. Designing for topical delivery: prodrugs can make the difference. *Medicinal Research Review*, n.23, v.6, p.763-793, 2003.

SOLLINGER, H.W. Mycophenolate mofetil. *Kidney International Supplement*, v.52, S14-S17, 1995.

Referências Bibliográficas

SOUZA, C.A. Estratégias de Tratamento da Leucemia Linfóide Crônica Recidiva incluindo Transplante de Célula Progenitora Hematopoiética. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 27, p. 283-286, 2005.

TAYLOR, A.L.; WATSON, C.J.E.; BRADLEY, A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical Review in Oncology/Hematology*, v.56, n.1, p.23-46, 2005.

TERPOS, E. Pomalidomide: a novel drug to treat relapsed and refractory multiple myeloma. *Oncology Targets Therapeutics*, v.10, n.6, p.531-538, 2013.

TIAN, C. Enantiomerization mechanism of thalidomide and the role of water and hydroxide ions. *Chemistry*, v. 18, n.45, p.14305-14313, 2012.

TSENG, S. Rediscovering thalidomide: a review of its mechanism of action, side effects and potential uses. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v.35, n. 6, p. 969-979, 1996.

VIJAY, S.; PATRICK, S.K. Nitric oxide in liver transplantation: Pathobiology and clinical implications. *Liver Transplantation*. v. 9, n.1, p. 1–11, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/jlts.2003.36244>.

VILLAROEL, M.C.; HIDALGO, M.; JIMENO, A. Mycophenolate mofetil: an update. *Drugs of Today*, v.45, n.7, p. 521-532, 2009.

WERMUTH, C.G. *The practice of medicinal chemistry*. 3rd. ed. Amsterdam; London: Academic, 2008.

Referências Bibliográficas

YAMASAKI, P.R. Synthesis and evaluation of novel dapsone-thalidomide hybrids for the treatment of type 2 leprosy reactions. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letter*, v.24, n.14, p.3084-3087, 2014.

ZAWILSKA, J.B; WOJCIESZAK, J.; OLEJNICZAK, A.B. Prodrugs: a challenge for the drug development. *Pharmacological Reports*, v. 65, n.1, p.1-14, 2013.

ZHU, Y.X.; MARTIN, K.; KORTUEM, K.M.; STEWART, A. K. Molecular mechanism of action of immune-modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leukemia & Lymphoma*. v. 54, n.4, p. 683-687, 2013.

ZI-QING, H.; HE-QING, H.; CHEN-FANG, L.; SHANG-RONG, L.; GANG-JIAN, L. Changes of Nitric Oxide & endothelin, thromboxane A₂ and prostaglandin in cirrhotic patients undergoing liver transplantation. *World Journal Gastroenterology*. v. 12, n. 25, p. 4049–4051, 2006.

ZWERNER, J.; FIORENTINO, D. Mycophenolate mofetil. *Dermatologic Therapy*, v.20, n.4, p. 229-238, 2007.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Planejamento, Síntese e Avaliação Farmacológica de Pró-Fármacos Derivados do Ácido Micofenólico Potencialmente Úteis Como Imunossuppressores", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 08/2017, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad referendum pela Coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 01 de junho de 2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril de 2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo/Swiss
Nº de animais	72
Peso/Idade	25-30g / 4-5 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Cemib-Campinas

Araraquara, 01 de junho de 2017.

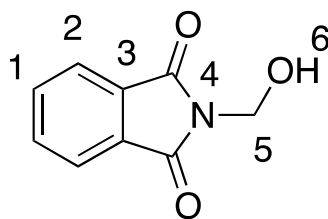


Profa Dra Carla Raquel Fontana Mendonça
Coordenadora da CEUA

**Espectros ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) e
espectrofotometria na região do infravermelho.**

1. Composto 2-(hidroximetil)isoindolin-1,3-diona (intermediário I)

Caracterização Estrutural



Infravermelho: ν OH = 3489 cm^{-1} ; ν C-H aromático = 3059 cm^{-1} ; ν C-H alquílico; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1772 cm^{-1} e 1751 cm^{-1} ; ν C-N-C imida = 1394 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; DMSO- d_6): δ 7,78 (dd; J=8,1 Hz) H1; 7,91 (dd; J=8,1 Hz); 5,27 (2H; s) ppm.

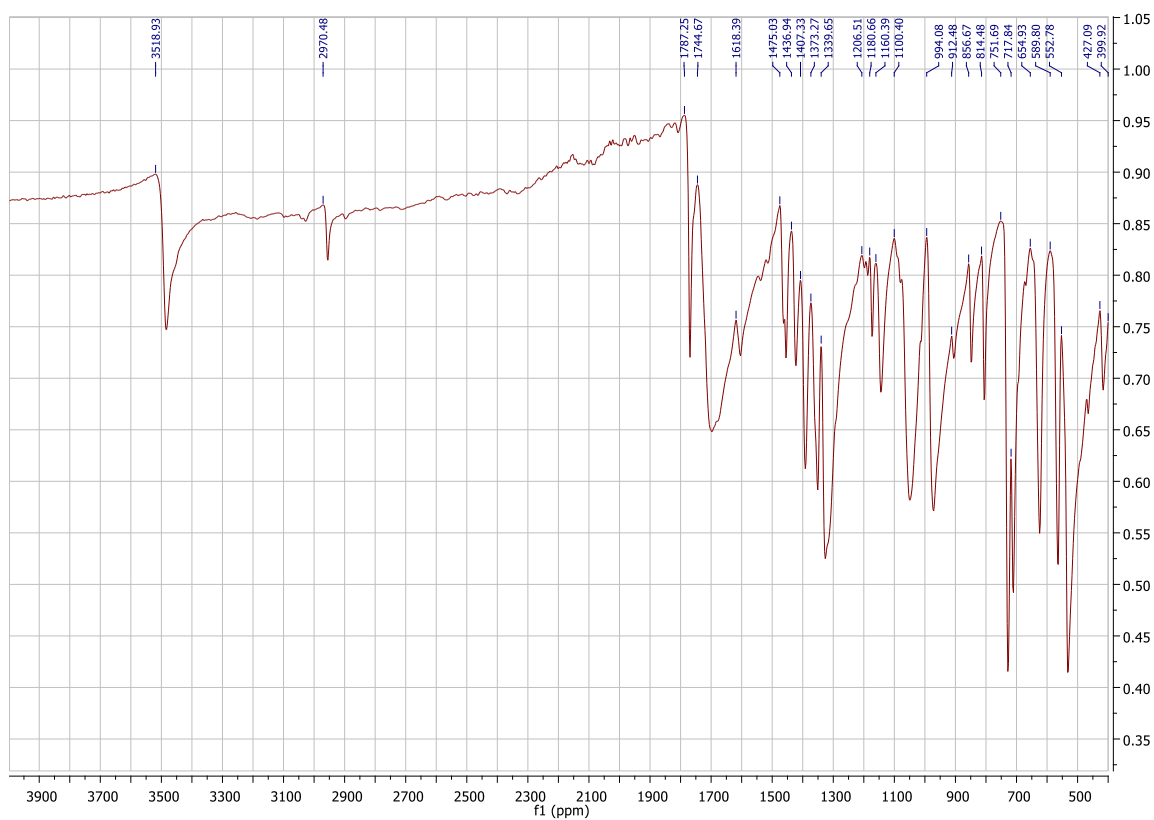


Figura 28: Espectro de infravermelho do Intermediário I

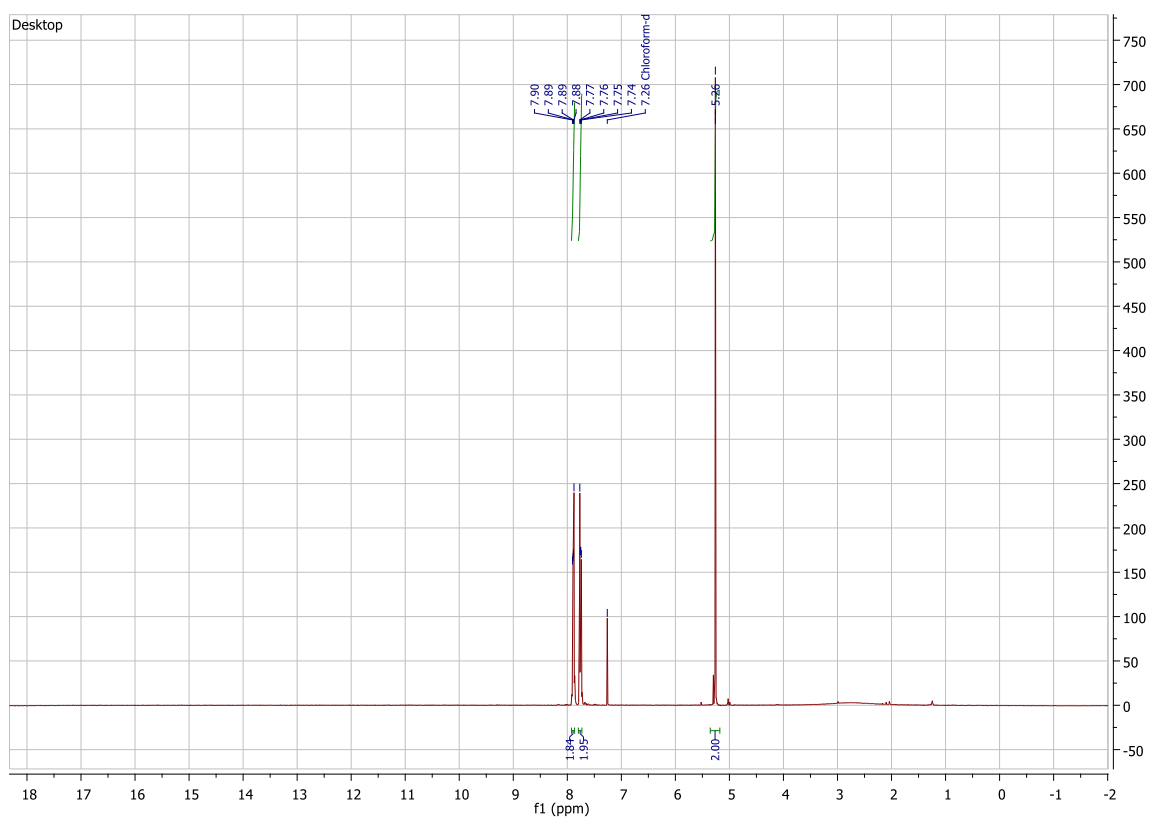
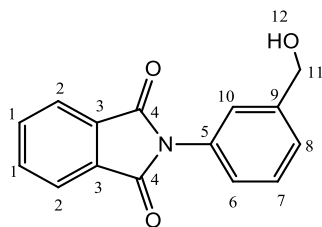


Figura 29:Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário I (RMN ^1H ; 300 MHz; CDCl_3).

2. Composto 2-(3-(hidroximetil)fenil)isoindolin-1,3-diona

(intermediário II)

Caracterização Estrutural:



Infravermelho: ν OH=3350 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3082 cm^{-1} ; ν C-H alquílico;=2937 cm^{-1} ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1772 cm^{-1} e 1714 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1654 e 1488 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1381 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3): δ 7,80 (dd; 1H; J=8 Hz) ; δ 7,80 (dd; 1H; J=8 Hz); δ 7,95 (dd; 1H; J=8 Hz); δ 7,95 (dd; 1H; J=8 Hz); 7,49 (d); 7,41(1H;d;J=7,6Hz);7,37 (2H; m); 4,76 (s) ppm.

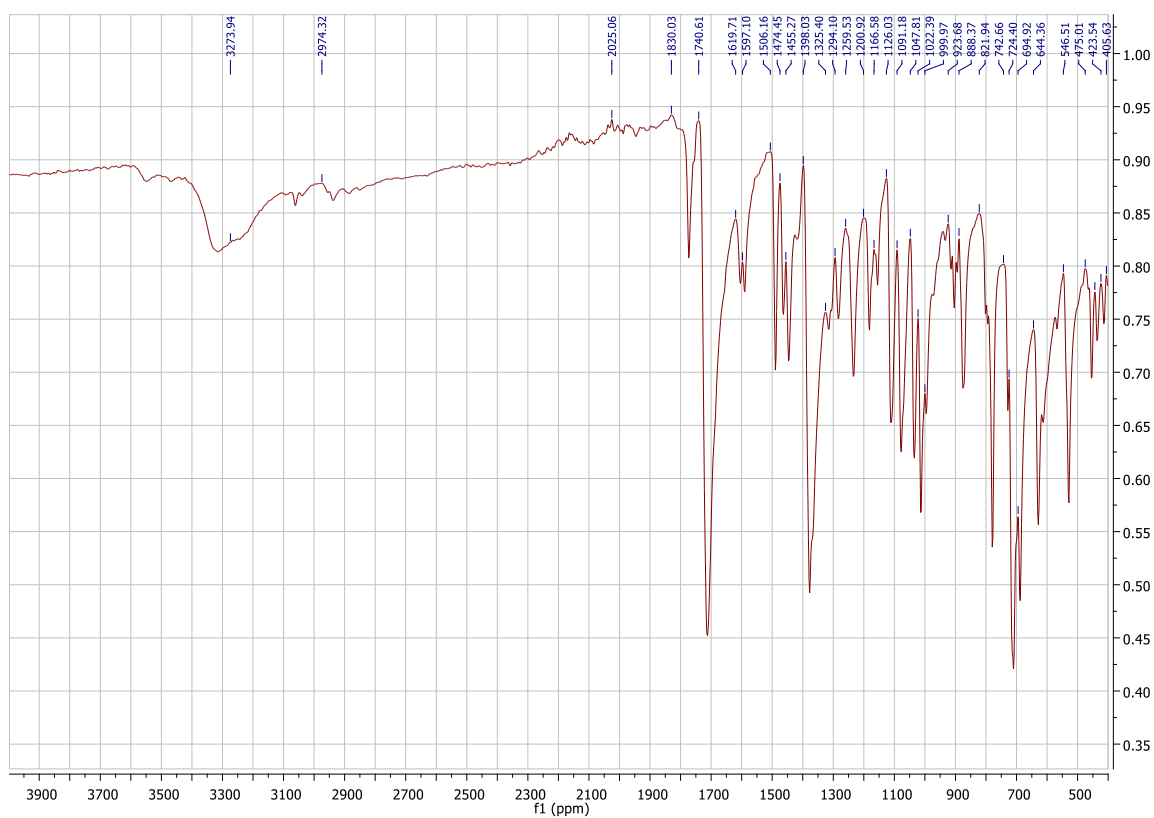


Figura 30: Espectro de Infravermelho do Intermediário II

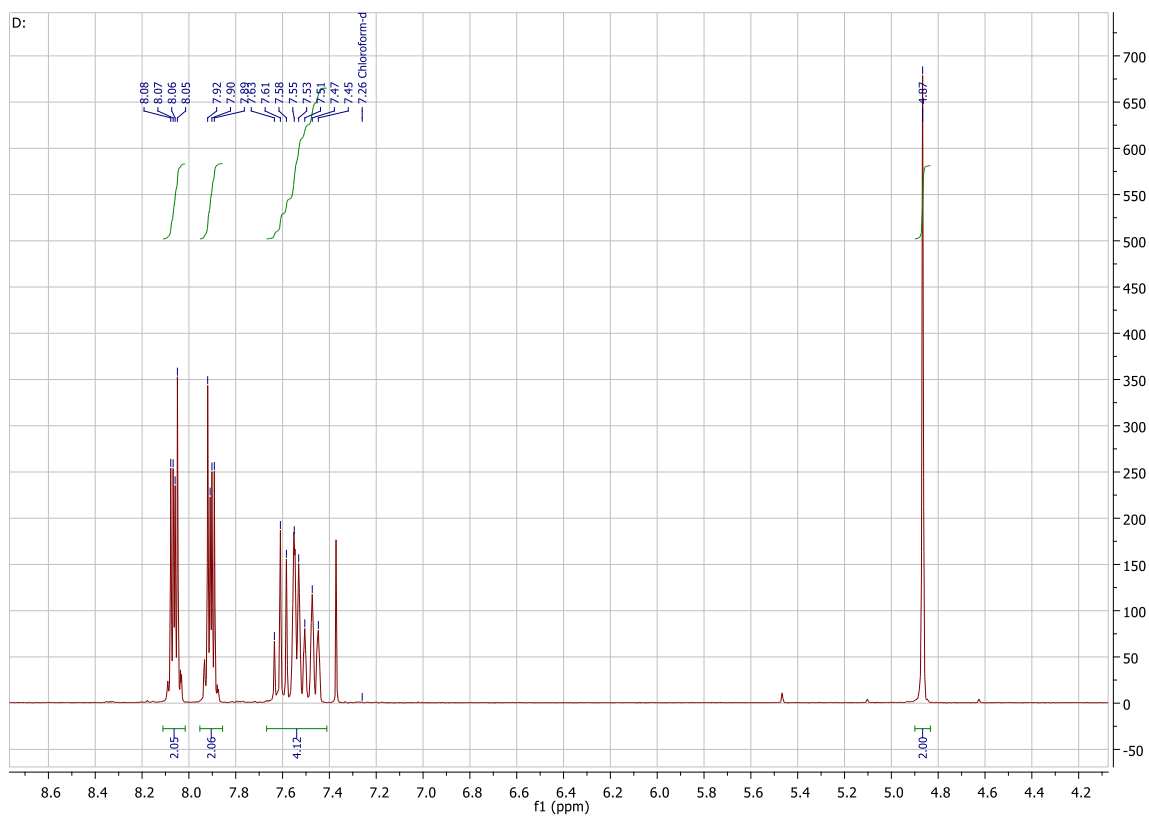
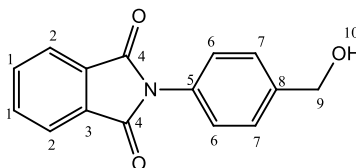


Figura 31: Espectro de ressonânciamagnética nuclear do Intermediário II (RMN ^1H ; 300 MHz; CDCl_3).

3. Composto (2-4-(hidroximetil)fenil)isoindolin-1,3-diona

(Intermediário III)

Caracterização Estrutural



Infravermelho: ν OH=3522 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3082 cm^{-1} ; ν C-H alquílico;=2916 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1764 cm^{-1} e 1705 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1600 e 1514 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1388 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3): δ 7,82 (dd; 1H; J=8 Hz) ; δ 7,95 (dd; 1H; J=8 Hz); δ 7,47 (d; 2H; J=7,9 Hz); δ 7,40 (d; 2H; J=7,9 Hz; 4,57 (s) ppm.

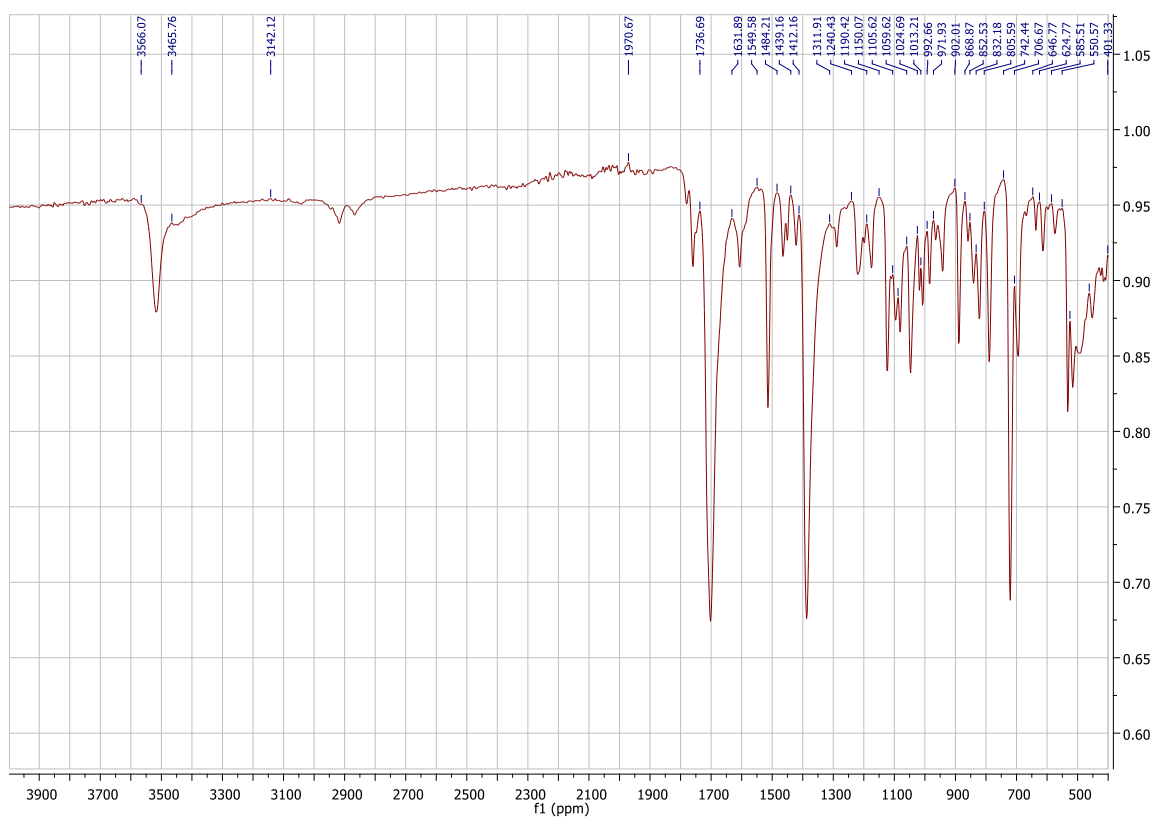


Figura 32: Espectro de Infravermelho do Intermediário III

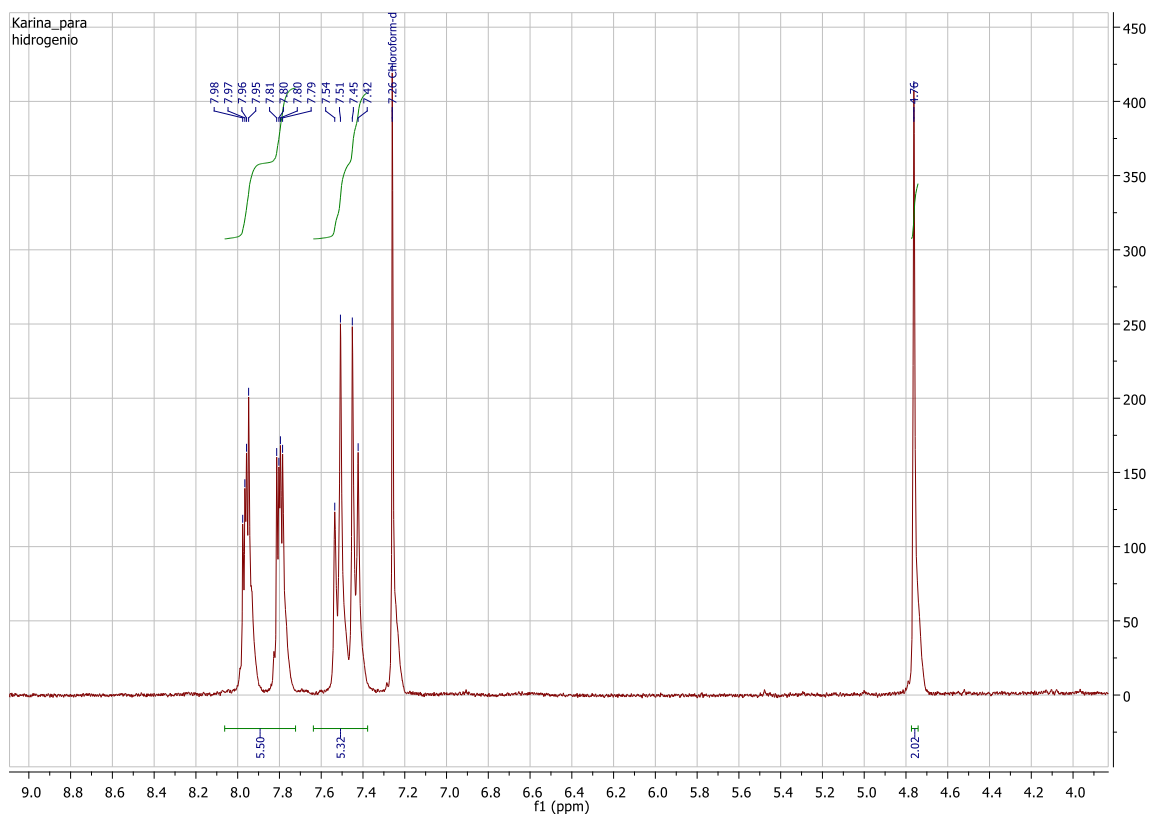
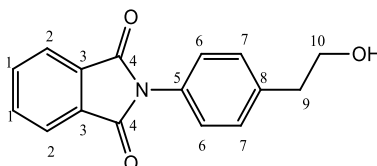


Figura 33: Espectro de Infravermelho do Intermediário III (RMN ¹H; 300 MHz; CDCl₃).

4. Composto (2-(4-hidroxietil)fenil)isoindolin-1,3-diona (intermediário

IV)

Caracterização Estrutural



Infravermelho: ν OH=3522 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3066 cm^{-1} ; ν C-H alquílico =2931 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1768 cm^{-1} e 1708 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1515 e 1471 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1388 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; CDCl_3): δ 7,82 (dd; 1H; J=8 Hz); δ 7,95 (dd; 1H; J=8 Hz); δ 7,36 (dd; 2H; J=7,9 Hz); δ 7,39 (dd); δ 7,39 (dd); 2,94(t) e 3,91(t)ppm.

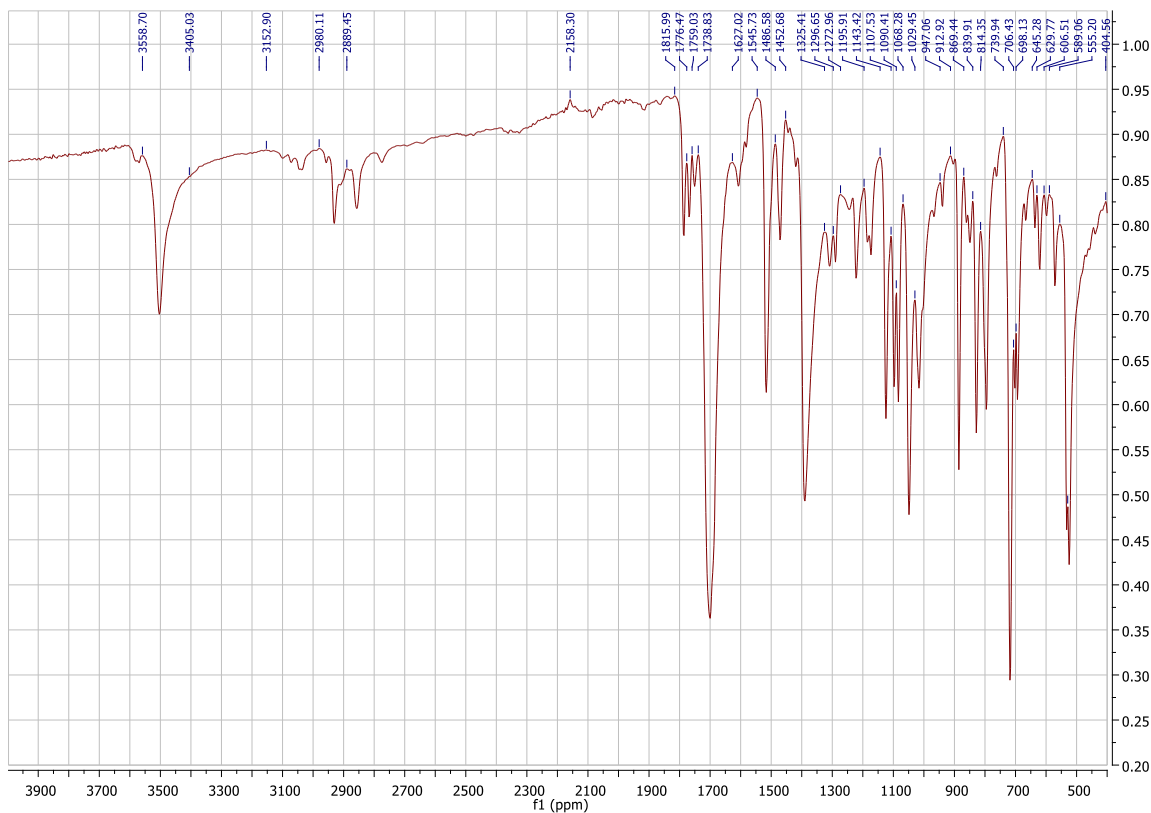


Figura 34: Espectro de Infravermelho do Intermediário IV

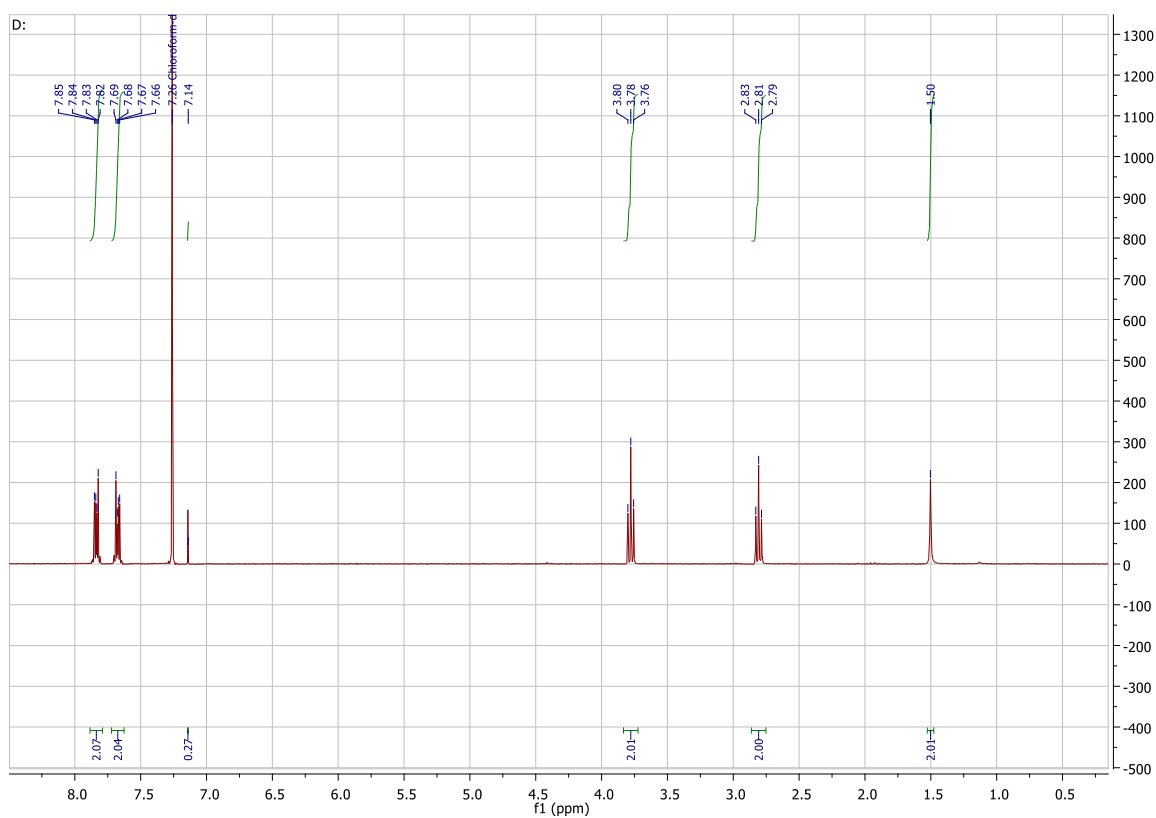
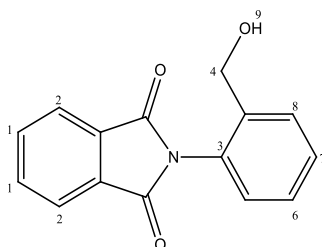


Figura 35: Espectro de Infravermelho do Intermediário IV (RMN ^1H ; 300 MHz; CDCl_3).

5. Composto 2-(2-(hidroximetil)fenil)isolin-1,3-diona (intermediário V)

Caracterização Estrutural:



Infravermelho: ν OH=3522 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3065 cm^{-1} ; ν C-H alquílico=2931 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1768 cm^{-1} e 1708 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1541 e 1471 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1388 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 7,82 (dd; 2H; $J=8$ Hz); δ 7,95 (dd; 2H; $J=8$ Hz); δ 3,5 (s; 2H); δ 7,37 e 7,40 (m e 4H)

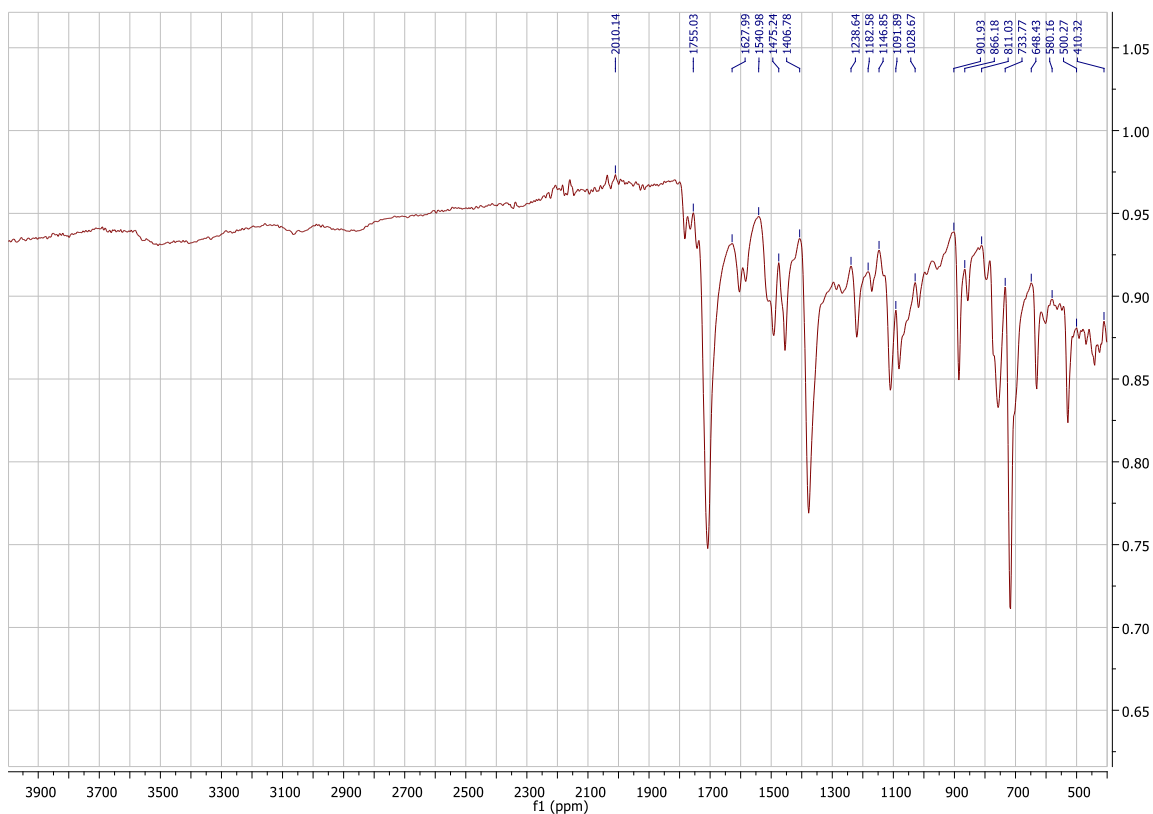


Figura 36: Espectro de Infravermelho do Intermediário V

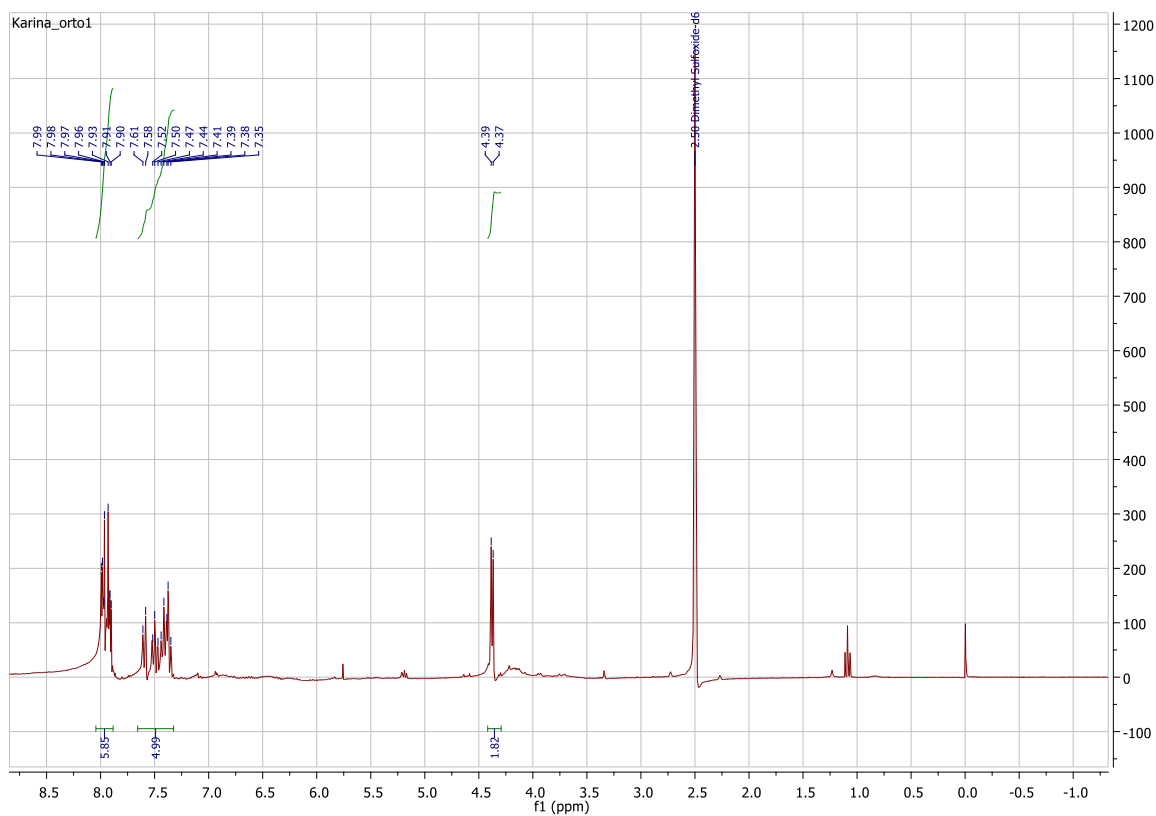
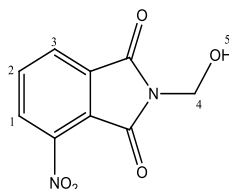


Figura 37: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário V (RMN ^1H ; 300 MHz; $\text{DMSO}-d_6$).

6.Composto 2-(hidroximetil)-4-nitroisoindolin-1,3-diona (intermediário VI)

Caracterização Estrutural



Infravermelho: ν OH=3361 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3046 cm^{-1} ; ν C-H alquílico;=2775 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1757 cm^{-1} e 1624 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1447 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1396 cm^{-1} ; ν N-O nitro= 1593 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d_6): δ 8,65 (dd; 1H; $J=8,5$ Hz) ; δ 8,18 (d; $J=8,2$ Hz); δ 8,55 (d; 1H; 8,5Hz); δ 5(d, 1H) e 6,5 (t e 1H).

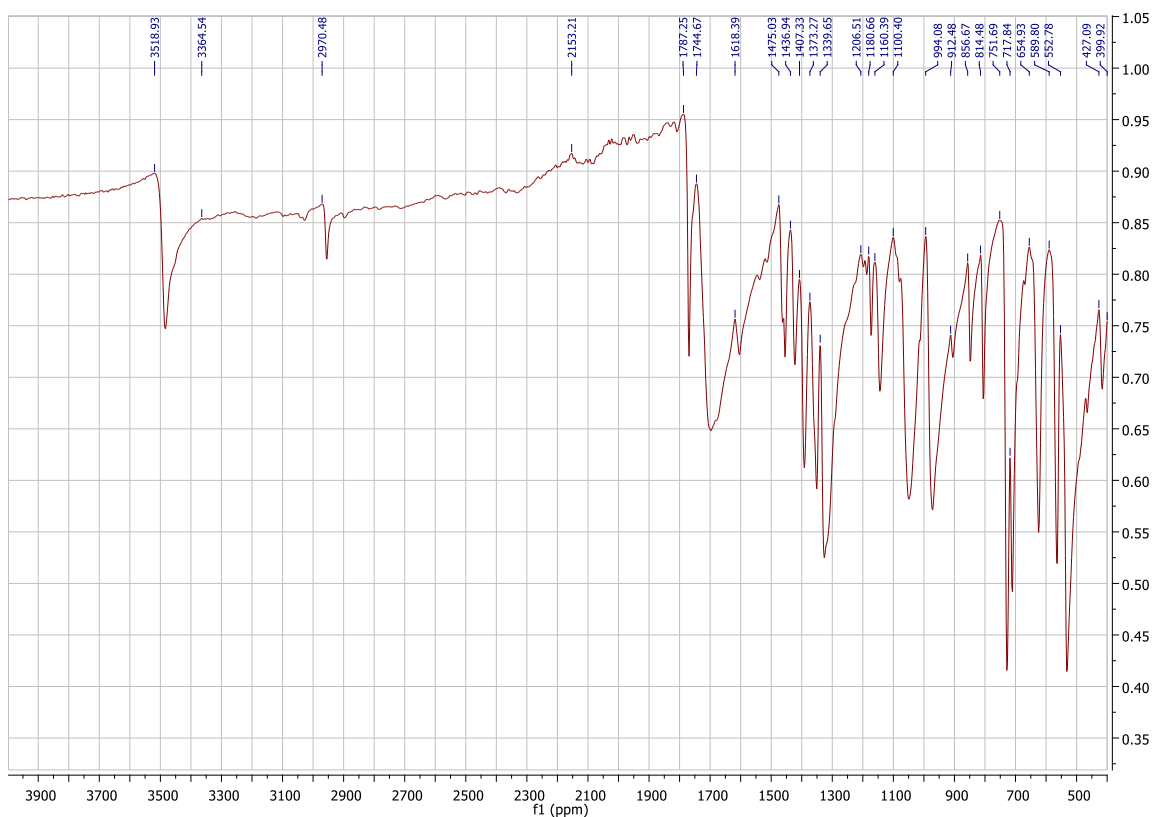


Figura 38: Espectro de Infravermelho do intermediário VI

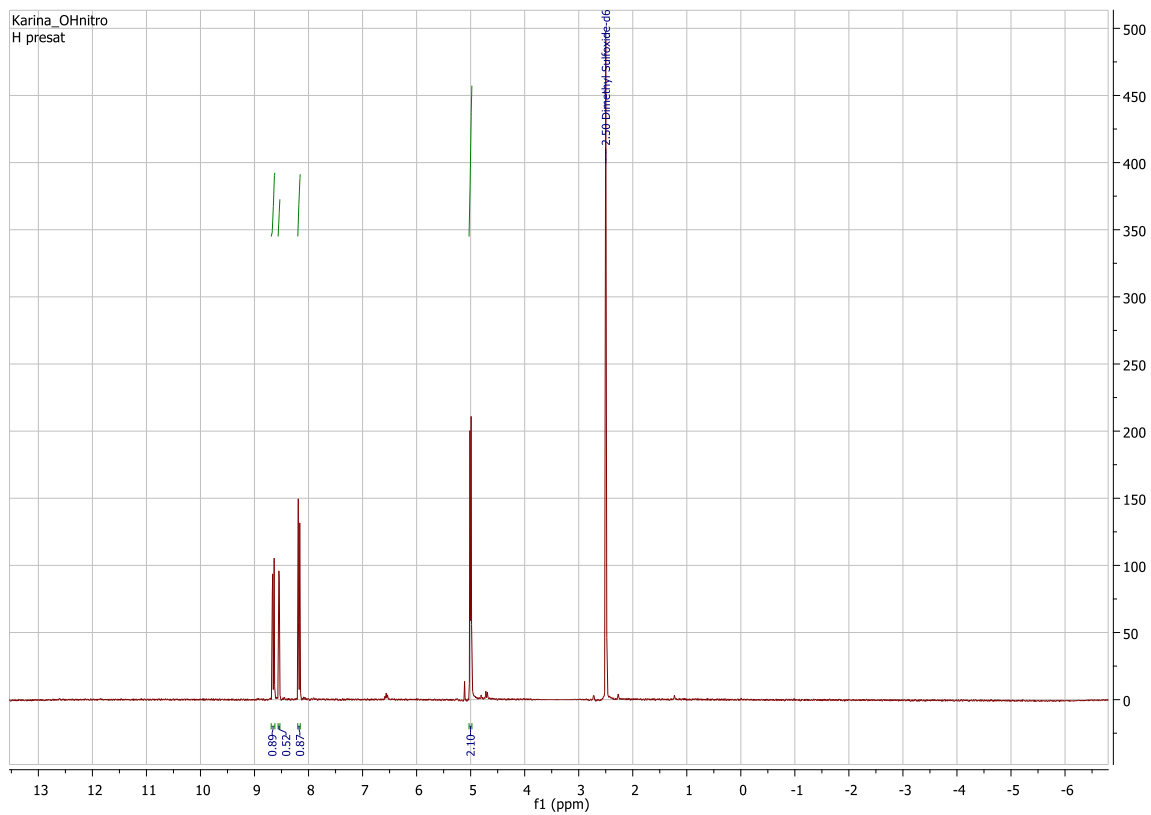
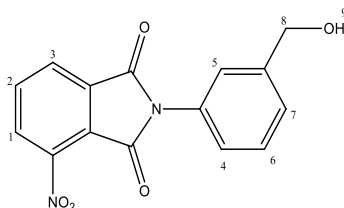


Figura 39: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário VI (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO d_6).

7.Composto 2-(3-hidroximetil)fenil)-4-nitroisindolin-1,3-diona

(intermediário VII)

Caracterização Estrutural:



Infravermelho: ν OH=3462 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3130 cm^{-1} ; ν C-H alquílico;=2890 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1764 cm^{-1} e 1626 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1476 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1313 cm^{-1} ; ν N-O nitro= 1563 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; DMSOd6): δ 8,35 (dd; 1H; J=7,8 Hz) ; δ 8,12 (t;1H;J=8Hz); δ 8,25 (d; 1H; 8 Hz); δ 7,40-7,47 (m, 3H); 7,55 (d e 1H)e 5,14 (s).

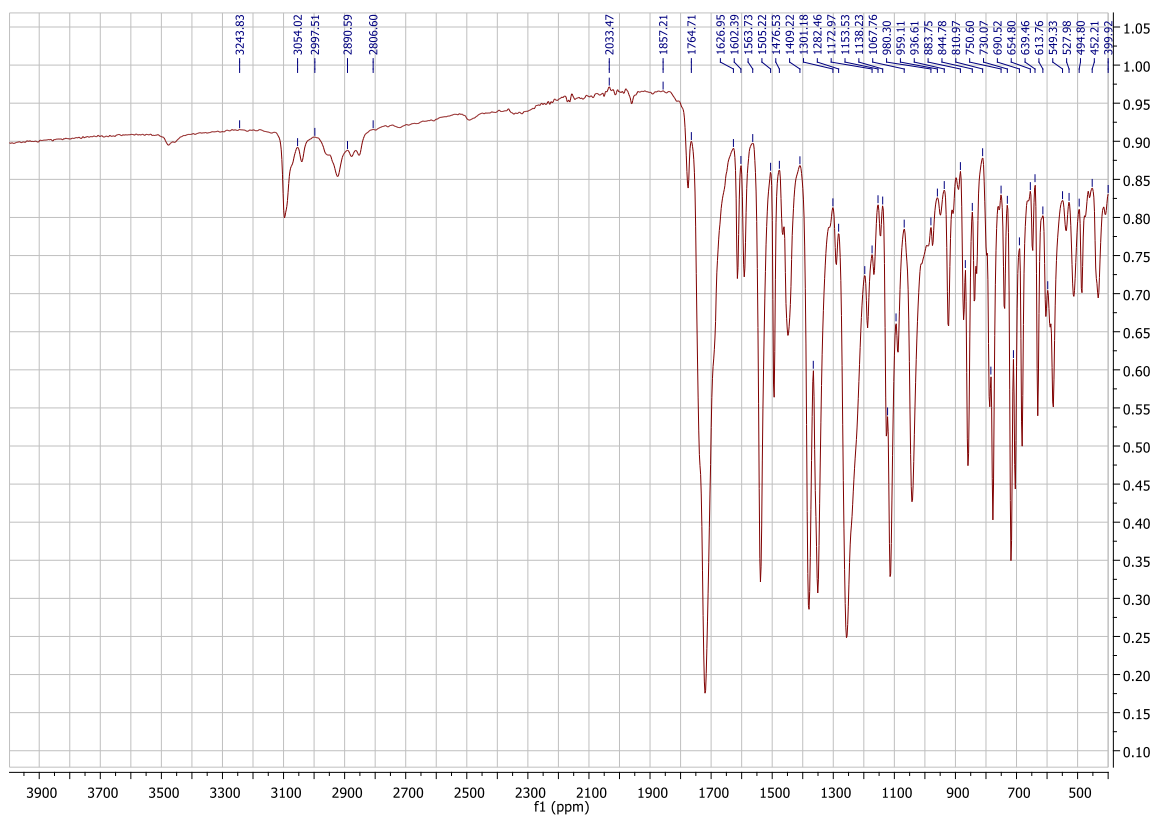


Figura 40: Espectro de Infravermelho do intermediário VII

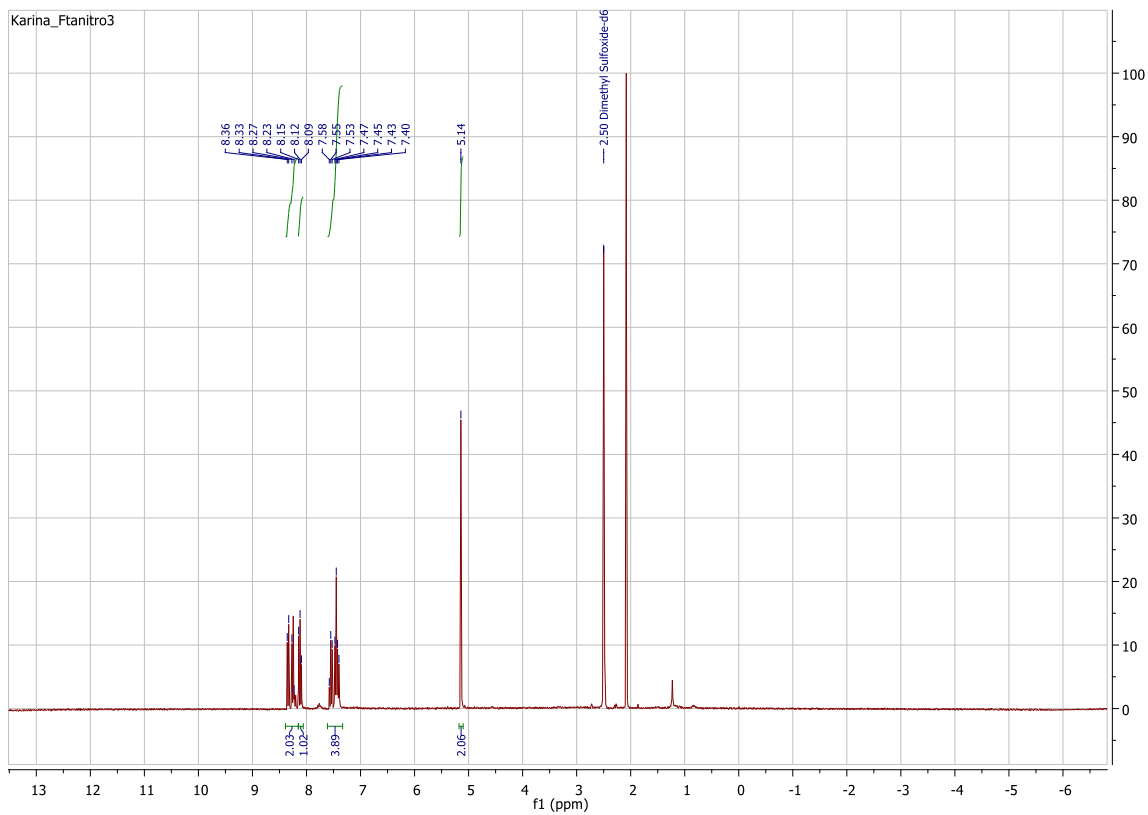
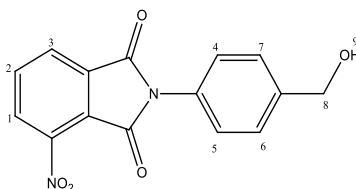


Figura 41: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário VII
(RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6).

8.Composto 2-(4-(hidroximetil)fenil)-4-nitroisindolin-1,3-diona

(Intermediário VIII)

Caracterização Estrutural



Infravermelho: ν OH=3618 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3120 cm^{-1} ; ν C-H alquílico =2964 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1797 cm^{-1} e 1625 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1477 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1304 cm^{-1} ; ν N-O nitro= 1566 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; DMSO- d_6): δ 8,34 (d; 1H; J=8,34 Hz); δ 8,11 (dd;1H; J=8,2 Hz); δ 8,25 (d; 1H; 8,3 Hz); δ 7,47 (dd, 2H,J=7,4 Hz); δ 7,38 (dd, 2H, 7,43 Hz); δ 4,56 (d; 2H)e δ 5,31;(t; 1H).

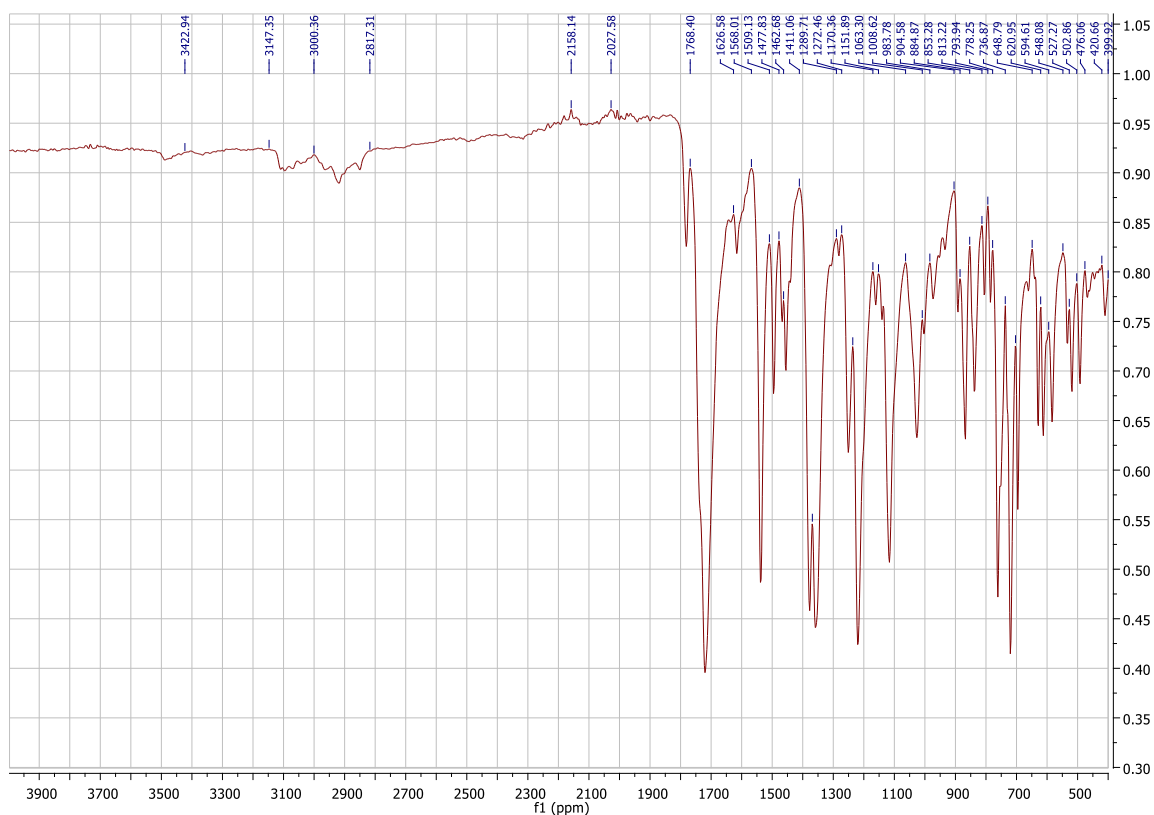


Figura 42: Espectro de Infravermelho do intermediário VIII

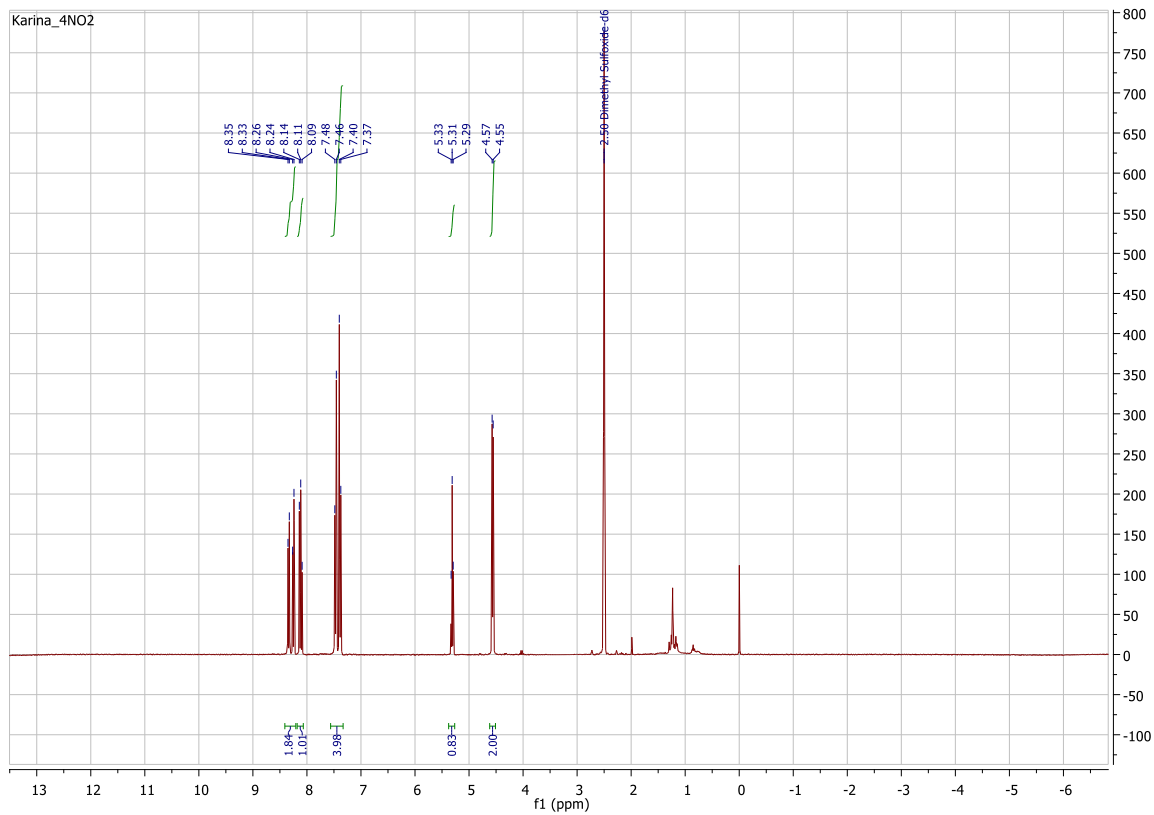
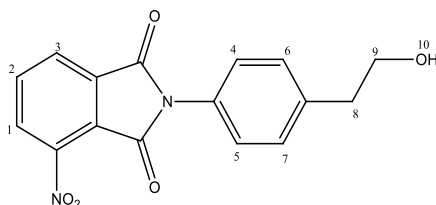


Figura 43: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário VIII
(RMN ¹H; 300 MHz; DMSO-d₆).

8. Composto 2-(4-(2-hidroximetil)fenil)-4-nitroisindolin-1,3-diona(Intermediário IX)

Caracterização Estrutural:



Infravermelho: ν OH=3353 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3112 cm^{-1} ; ν C-H alquílico =2984 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1762 cm^{-1} e 1624 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1403 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1364 cm^{-1} ; ν N-O nitro= 1567 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d₆): δ 8,34 (d; J=8,2 Hz); δ 8,10 (dd; 1H; J=8,2 Hz); δ 8,24 (d; 1H; 8,2 Hz); δ 7,37 (dd, 2H, J=7,8 Hz); δ 7,33 (dd, 2H, 7,8 Hz); δ 2,78 (t; 2H) e δ 3,66 (q; 2H) e δ (4,71, t e 1H).

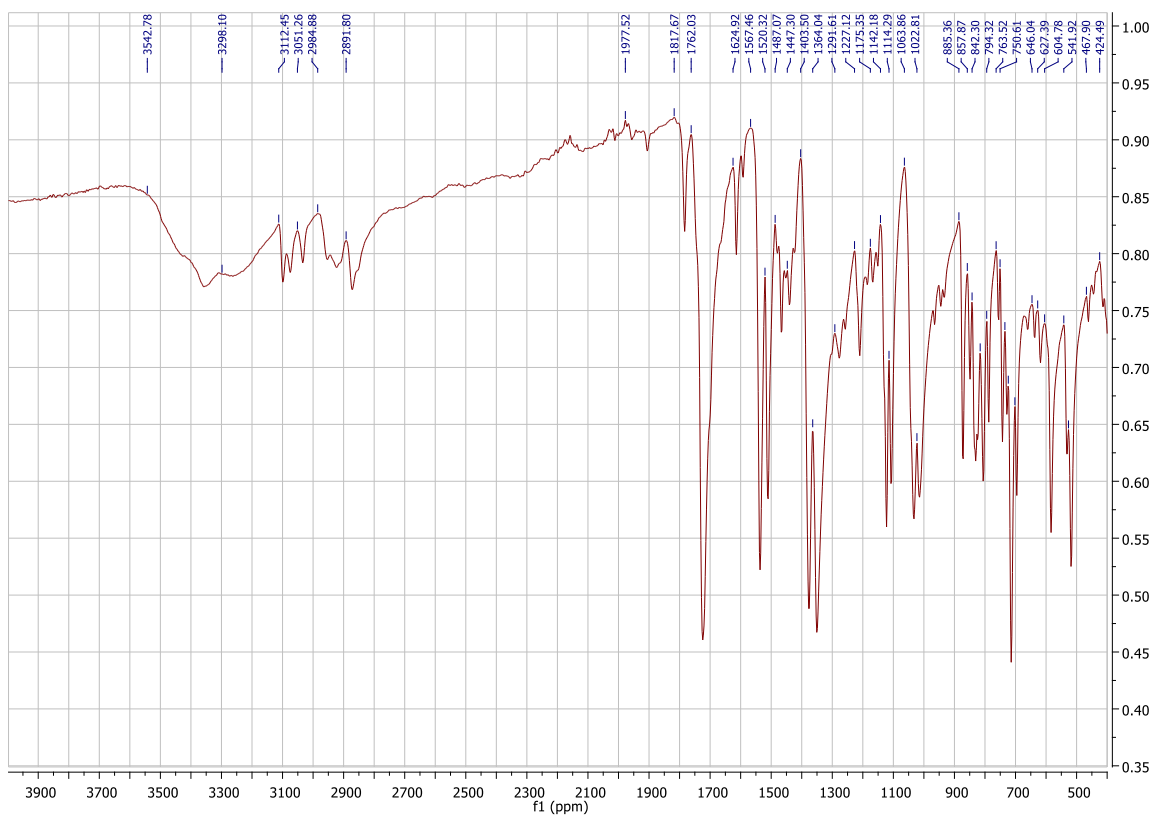


Figura 44: Espectro de Infravermelho do intermediário IX

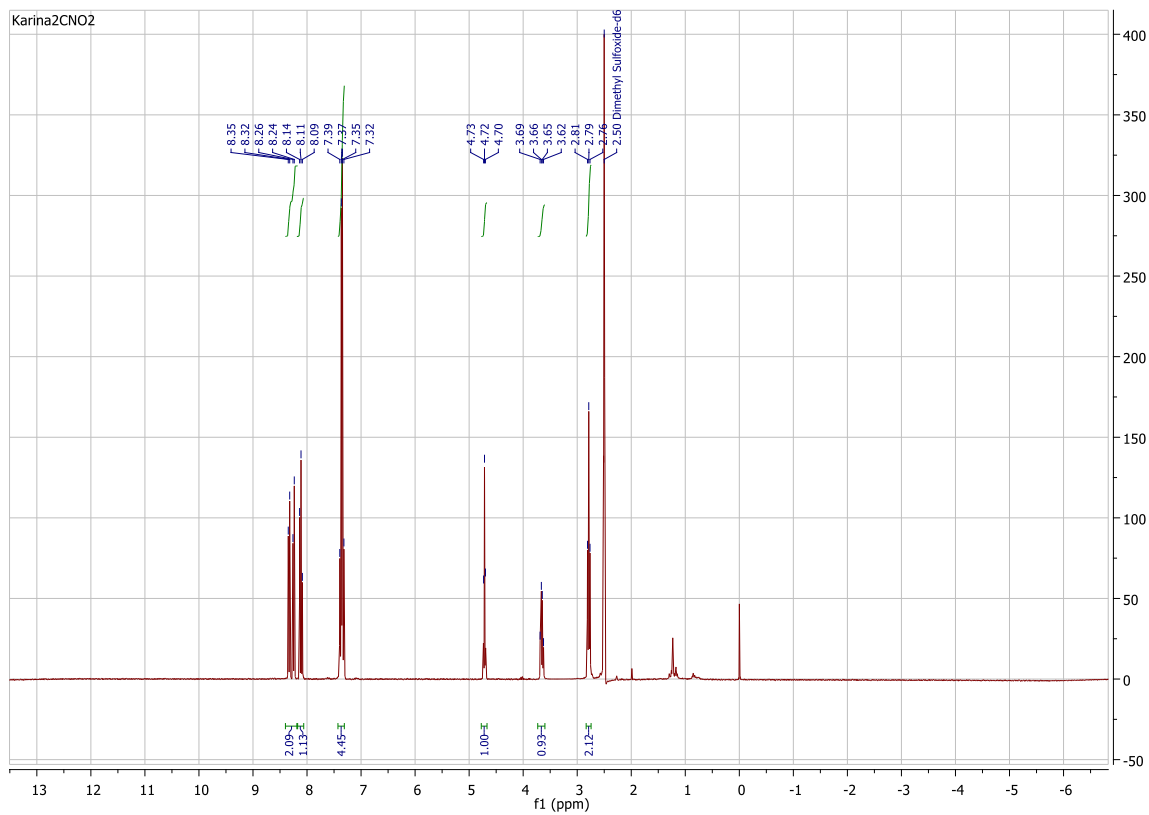
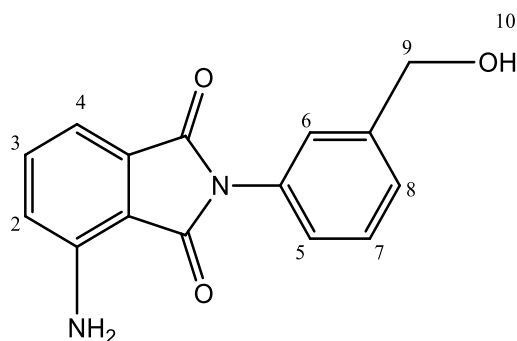


Figura 45: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário IX (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6).

9. Composto 4-amino-2-(3-(2-hidroxietil)fenil)isoindolin-1,3-diona(intermediário X)

Caracterização Estrutural



Infravermelho: ν OH=3542 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3132 cm^{-1} ; ν C-H alquílico;=2945 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1798 cm^{-1} e 1648 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1421 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1390 cm^{-1} ; ν N-H amina= 3370 e 3466 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; DMSO-d₆): δ 7,03-7,06 (m; 2H); δ 7,35 (m; 2H); δ 7,03-7,06 (m; 2H); δ 7,43-7,52 (m; 2H); δ 7,35 (m, 1H); δ 7,26 (d; 1H; J=7,7 Hz); δ 4,55 (d; 2H) e δ 5,32 (t) ppm.

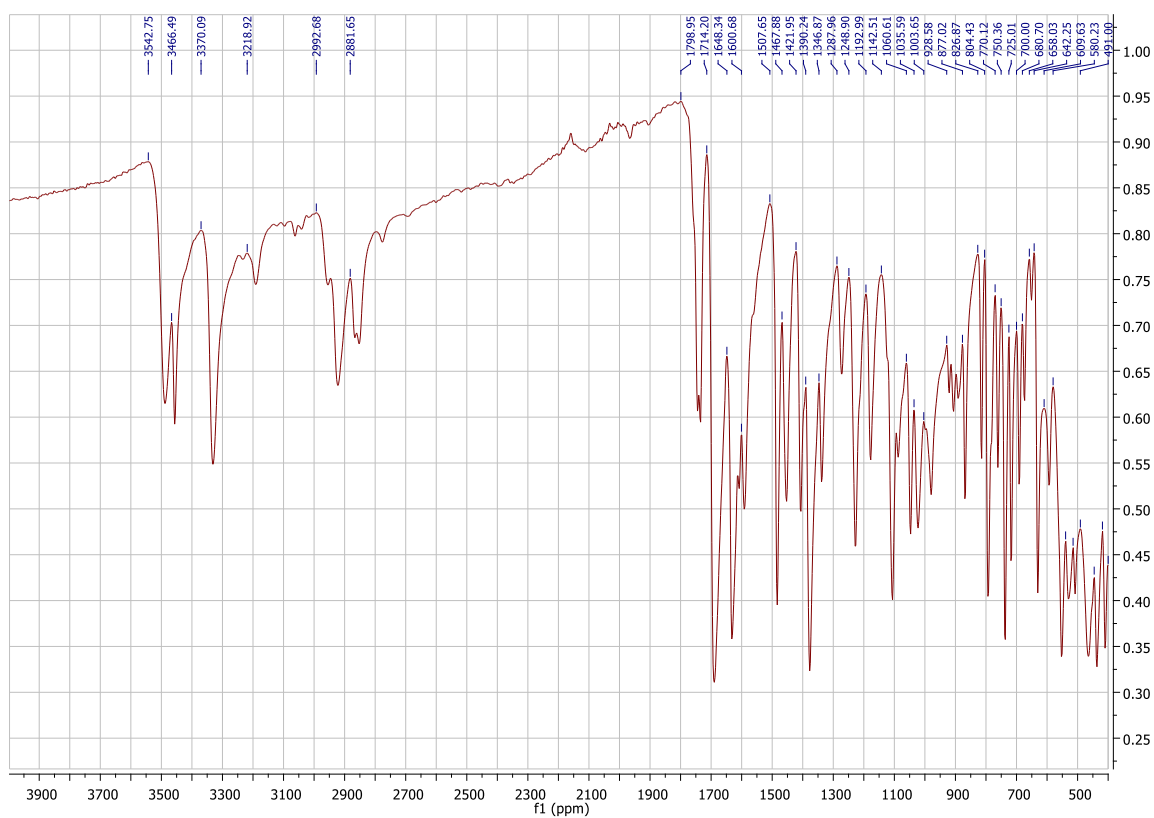


Figura 46: Espectro de Infravermelho do Intermediário X

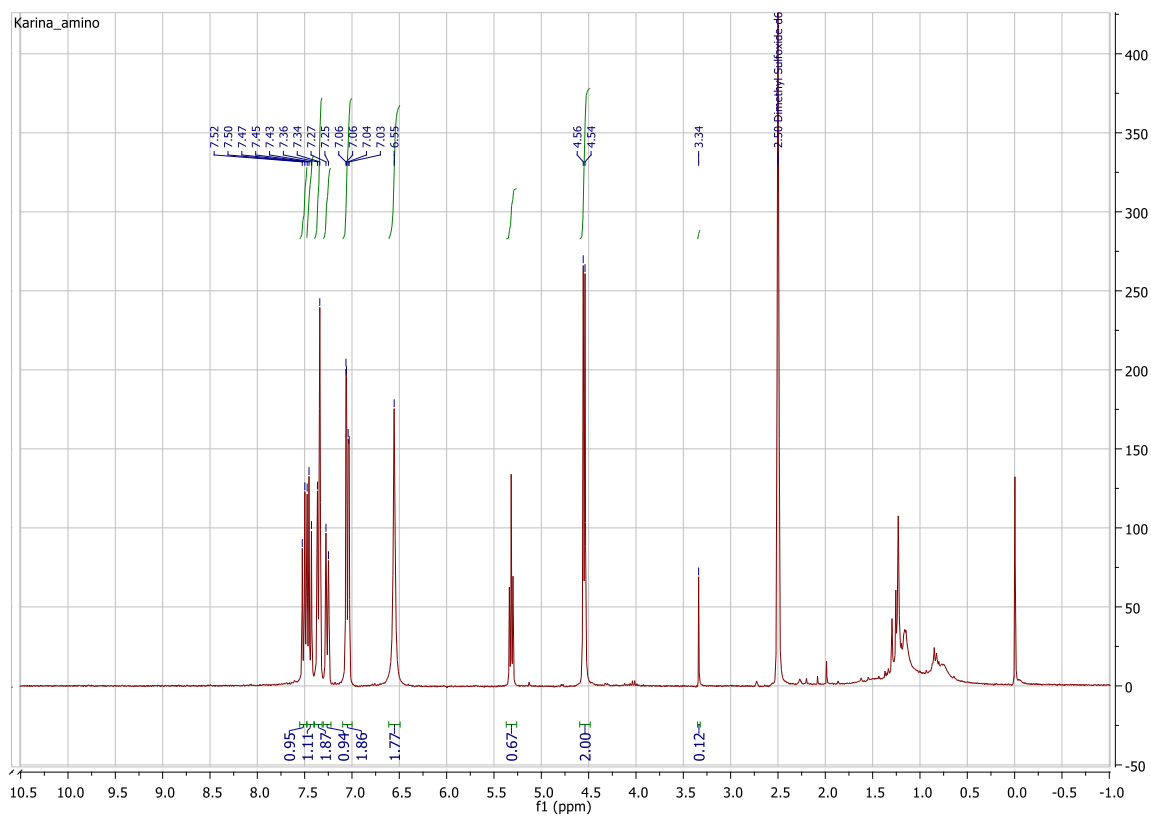
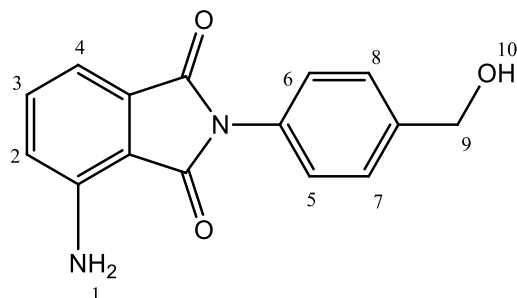


Figura 47: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário X(RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6).

10. Composto 4-amino-(2-(4-(2-hidroxietil)fenil)isoinolin-1,3-diona (intermediário XI)

Caracterização Estrutural



Infravermelho: ν OH=3480 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3147 cm^{-1} ; ν C-H alquílico;=2888 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1768 cm^{-1} e 1642 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1477 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1289 cm^{-1} ; ν N-H amina= 3054 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; DMSOd6): δ 7,31 (d; 1H) ; δ 8,03 (m); δ 7,55-7,67 (m;3H); δ e δ 5,09 (s,1H) ppm.

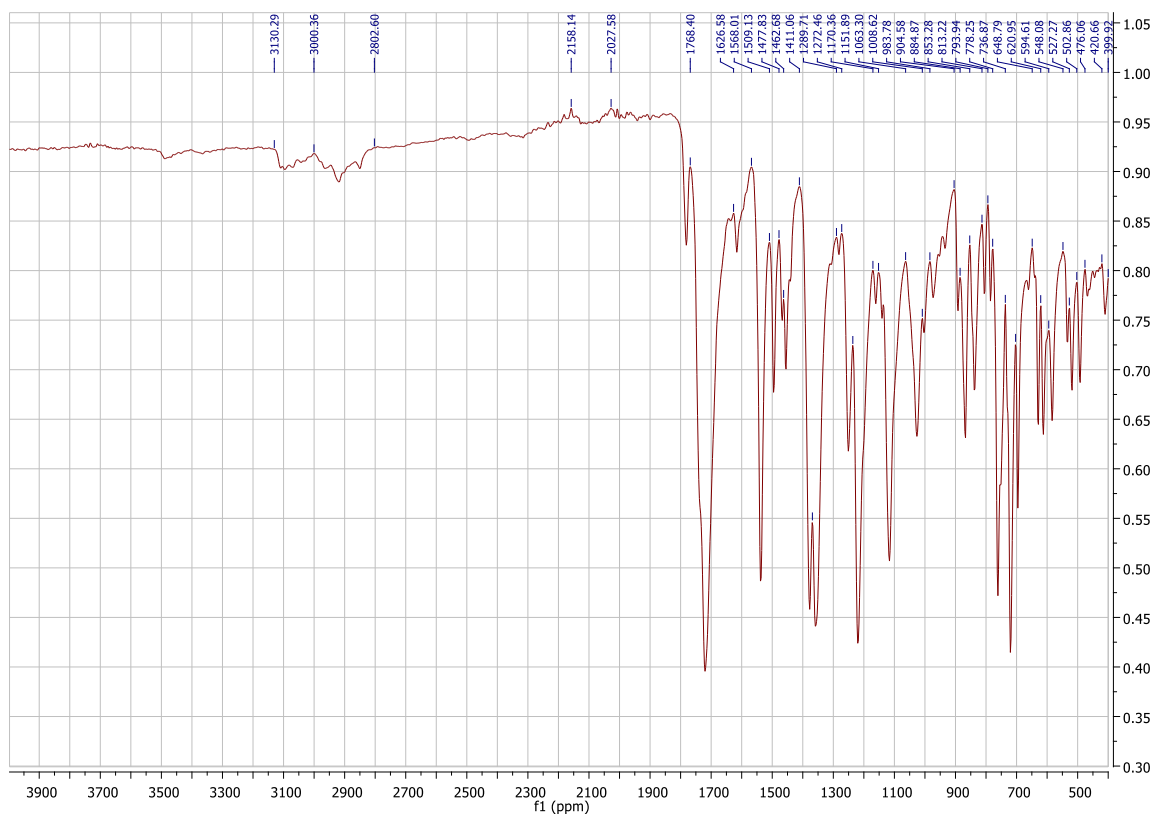


Figura 48: Espectro de Infravermelho do intermediário XI.

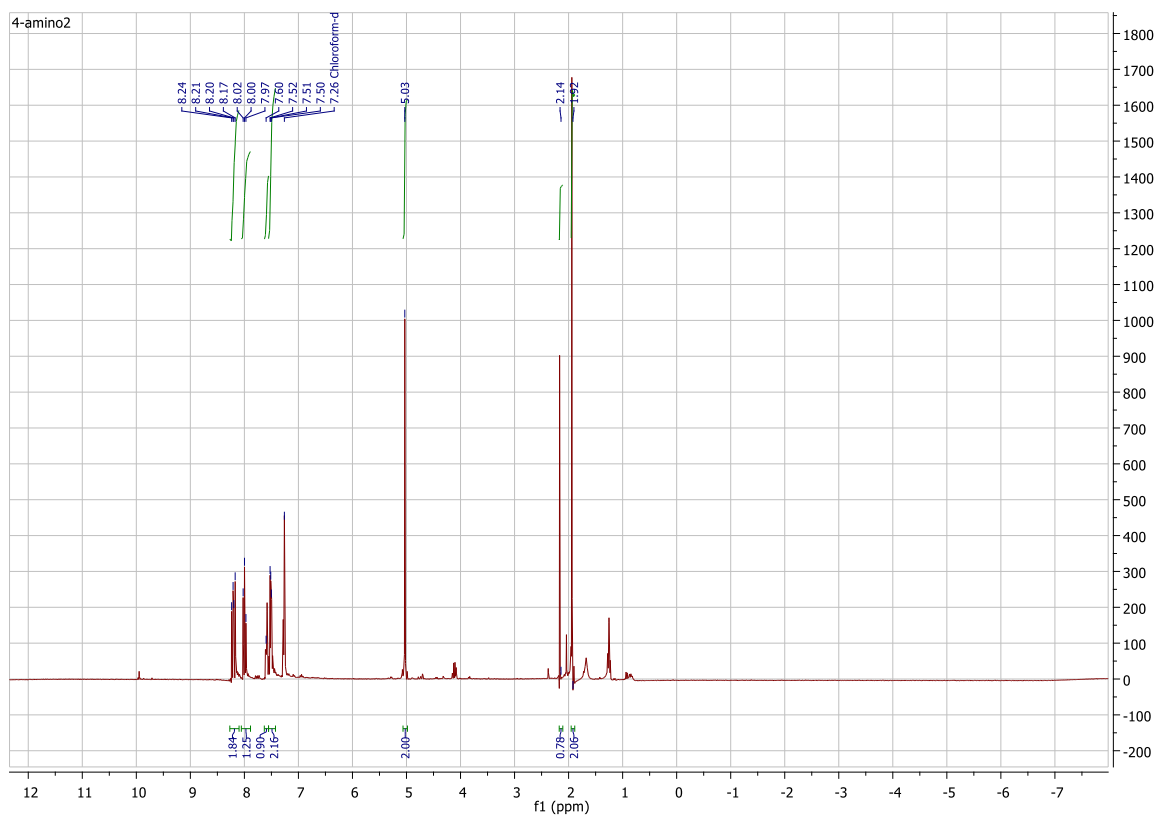
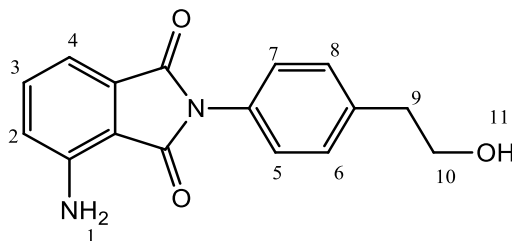


Figura 49: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário XI(RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO-d_6).

11. Composto 4-amino-2-(4-(2-hidroxietil)fenil)isoindolin-1,3-diona (intermediário XII)

Caracterização Estrutural



Infravermelho: ν OH=3514 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3420 cm^{-1} ; ν C-H alquílico =2982 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1723 cm^{-1} e 1649 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1448 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1392 cm^{-1} ; ν N-H amina= 3383 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; DMSO d_6): δ 7,03-7,07 (m) ; δ 7,51 (dd, 7,5 Hz); δ 7,03-7,07 (m); δ 7,28-7,36 (m); 2,78 (t, 2H); 3,67 (q, 2H) e δ 4,71 (t,1H) ppm.

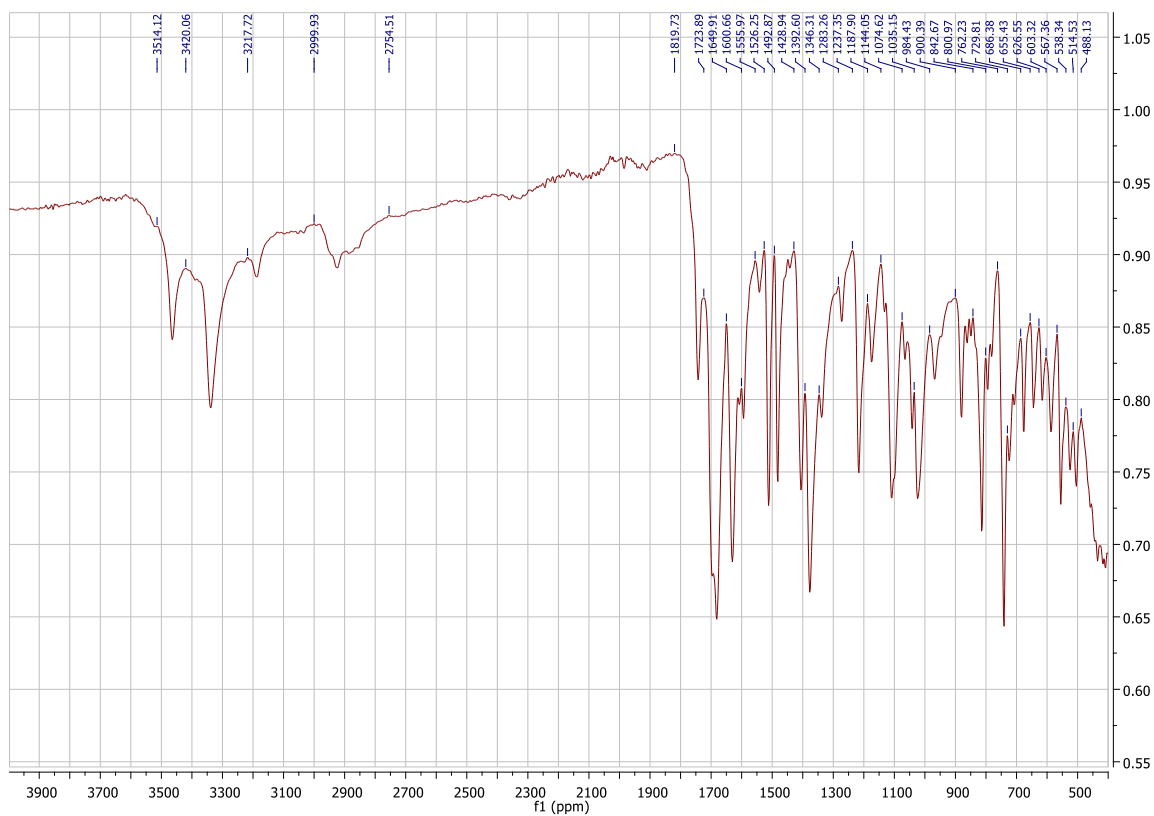


Figura 50: Espectro de infravermelho do Intermediário XII.

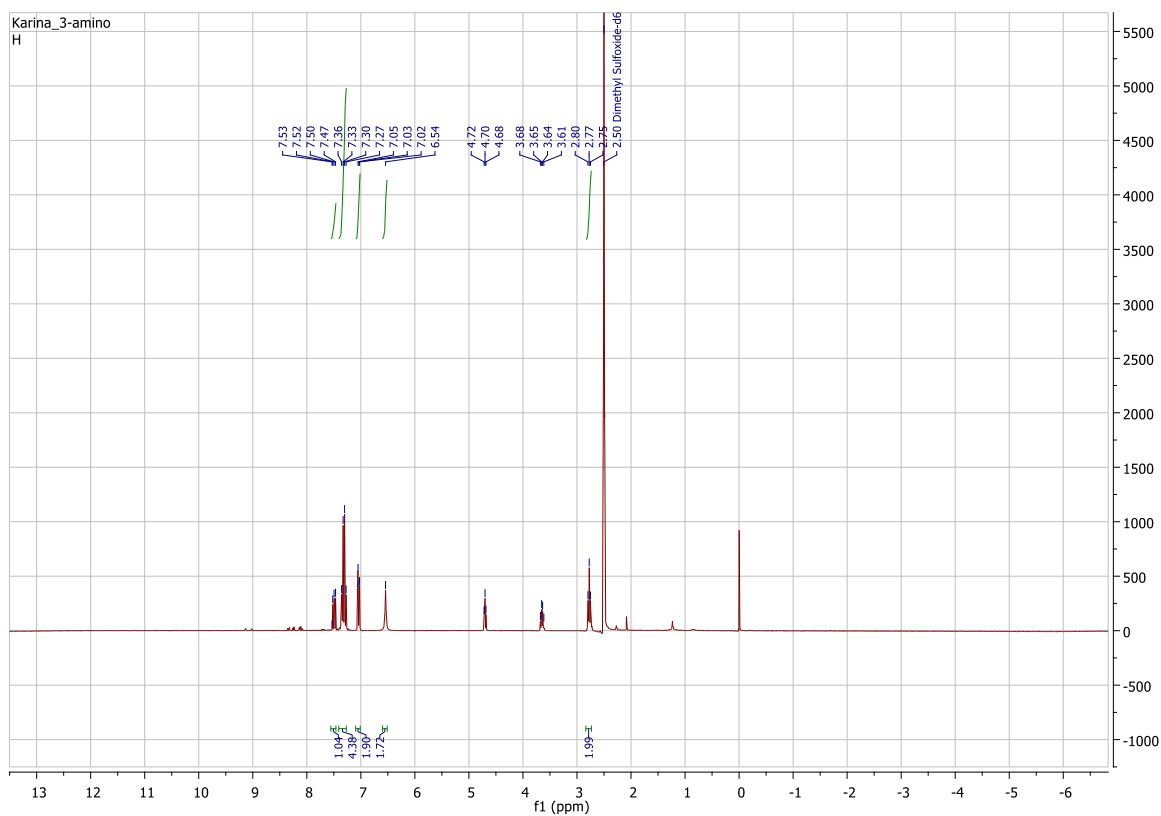
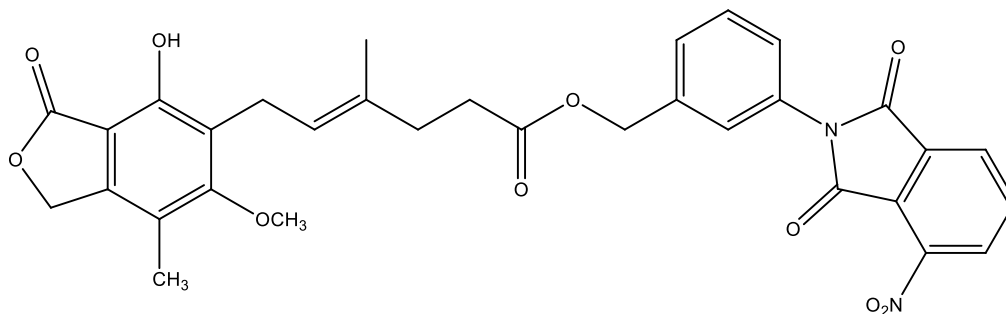


Figura 51: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do intermediário XII
(RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO d_6).

12. Pró-Fármaco



(E)-3-(4-nitro-1,3-dioxoisindolin-2-il)benzil 6-(4-hidroxi-6-methoxi-7-metil-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofuran-5-il)-4-metilhex-4-enoato

Infravermelho: ν OH (fenólico)=3445 cm^{-1} ; ν C-H aromático= 3420 cm^{-1} ; ν C-H alquílico;=2929 cm^{-1} ; ν C=O imida (simétrico e assimétrico) = 1780 cm^{-1} e 1649 cm^{-1} ; ν C=C aromático= 1440 e 1610 cm^{-1} ; ν C-N-C imida=1357 cm^{-1} ; ν C=O éster= 1750; 1715 e 1610 cm^{-1} ; ν C-O-C= 1114 cm^{-1} .

RMN ^1H (300 MHz; DMSOd6): δ 8,24-8,34 (m) ; δ 7,39 (dd, 7,5 Hz); δ 7,39-7,50 (m); 5,22 (t, 2H); 5,08 (t, 2H) e δ 3,66 (t,2H) ppm; δ 2,05 (t,2H) ppm; δ 1,76 (t,3H) ppm.

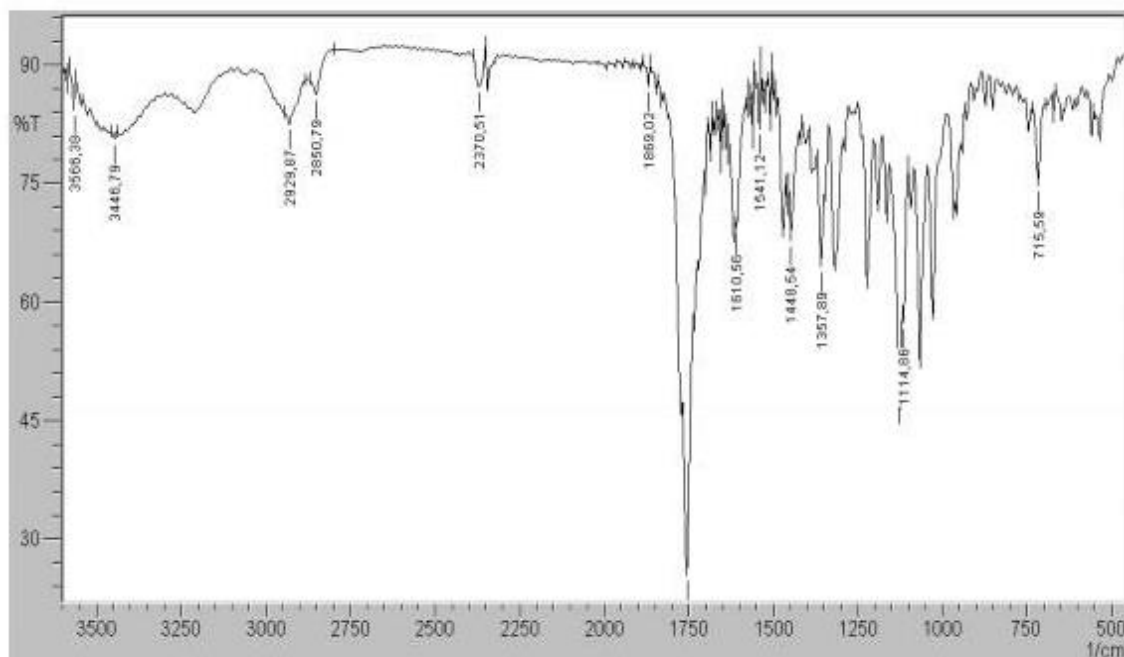


Figura 52: Espectro de infravermelho do pró-fármaco.

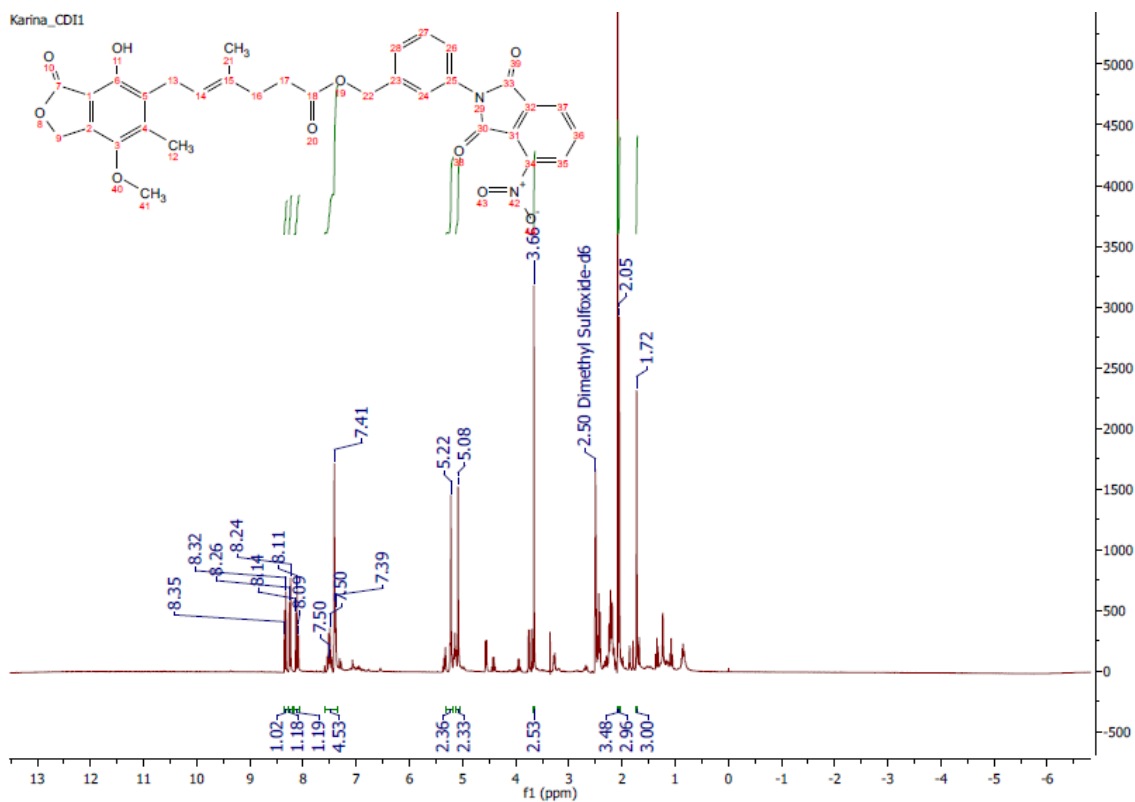


Figura 53: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear do pró-fármaco (RMN ^1H ; 300 MHz; DMSO- d_6).

Ensaio Biológicos**Tabela 13:** valores de viabilidade celular (%)

Compostos Concentração (µM)	Viabilidade celular (%)					
	6,25	12,5	25	50	100	200
I	49,64*	54,57*	57,01*	56,56*	51,77*	50,75*
II	99,40	99,60	99,43	99,84	99,13	98,71
III	98,43	98,95	97,97	98,03	98,16	95,63
IV	95,86	73,51*	74,28*	81,87	71,81*	71,73*
V	97,91	99,06	97,30	98,33	99,37	98,50
VI	100	100	100	100	100	99,41
VII	100	100	100	95,95	90,71	81,64
VIII	100	100	100	100	100	100
IX	82,26	76,83*	68,16*	58,15*	48,32*	49,93*
X	100	98,99	92,10	91,65	80,91*	45,45*
XI	94,57	94,08	95,52	98,20	94,84	93,24
XII	100	99,47	96,01	93,15	96,04	88,69
X+AM	90,80	95,96	91,36	90,81	65,92*	44,33*
VII+ AM	62,98*	59,97*	54,19*	55,45*	64,83*	64,67*
Ester	100	100	99,33	99,87	100	96,02
AM	92,37	100	100	96,14	97,31	86,45
POM	96,97	100	100	99,95	31,75*	4,62*

*valores estatisticamente significativos em relação ao CN (meio RPMI) (100% de viabilidade).

Tabela 14: valores de produção de TNF- α (pg/mL) em macrófagos murinos

Compostos Concentração (μ M)	TNF- α (pg/mL)			
	12,5	25	50	LPS
I	-	-	-	-
II	1438,94	1353,51	1553,73	1601,55
III	1674,36	1685,11	1570	1601,55
IV	899,7*	920,02*	1039	1601,55
V	708,05*	798,1*	917,23*	1601,55
VI	1400,45	1249,9	1226,7	1601,55
VII	1447,5	1154,6*	1058,94*	1601,55
VIII	1739,37	1600,77	1536,8	1601,55
IX	1280,6	1156,9	810,02*	1601,55
X	707,65*	723,22*	565,17*	1601,55
XI	1319,65	1512,18	1458,7	1601,55
XII	1577,2	1545,6	1500	1601,55
X+AM	1479,4	1621,9	1771,2	1601,55
VII+AM	1629,5	1347,8	1401,1	1601,55
AM	821,08*	850,78*	-	1601,55
POM	1682,79	1720,4	1559,17	1601,55
Pró-fármaco	1406,13	1303,17	1128,67*	1601,55

*valores estatisticamente significativos em relação ao LPS.

Tabela 15: valores de produção de IL-1 β (pg/mL) em macrófagos murinos

Compostos Concentração (μ M)	IL-1 β (pg/mL)			
	12,5	25	50	LPS
I	-	-	-	-
II	1610	1547	1640	1460,64
III	1346	1649	1277	1460,64
IV	1031*	1002*	1312	1460,64
V	1450	1597	1202	1460,64
VI	1245	1271	1401	1460,64
VII	1134*	1263	1000*	1460,64
VIII	972*	1088*	1171*	1460,64
IX	1132	1271	1237	1460,64
X	1282	1047*	937*	1460,64
XI	1626	1306	1172*	1460,64
XII	1148	1276	1281	1460,64
X+AM	1653	1437	1027*	1460,64
VII+AM	1240	1177	734*	1460,64
AM	1280	1230	-	1460,64
POM	1383	1270	1301	1460,64
Pró-fármaco	1023*	1086*	671*	1460,64

*valores estatisticamente significativos em relação ao LPS.

Anexo II

Tabela 16: valores de produção de NO (μmol) em macrófagos murinos.

Compostos	NO				
Concentração (μM)	12,5	25	50	LPS	**CN
I	-	-	-	-	-
II	12,34	13,51	16,04	17,44	1,821
III	12,82	13,58	14,09	17,44	1,821
IV	11,16*	10,99*	11,50*	17,44	1,821
V	13,61	8,33*	6,44*	17,44	1,821
VI	14,92	15,25	15,73	17,44	1,821
VII	12,81	12,61	9,48*	17,44	1,821
VIII	11,16*	10,99*	11,50*	17,44	1,821
IX	13,26	14,96	16,04	17,44	1,821
X	7,15*	6,74*	6,88*	17,44	1,821
XI	11,43*	10,15*	9,58*	17,44	1,821
XII	11,07*	11,88*	9,75*	17,44	1,821
X+AM	9,61*	8,90*	9,15*	17,44	1,821
VII+AM	14,55	15,72	10,02*	17,44	1,821
Pró-fármaco	12,20*	15,23	10,10*	17,44	1,821
AM	18,11	13,83	16,69	17,44	1,821
POM	17,34	17,71	16,63	17,44	1,821

*valores estatisticamente significativos em relação ao LPS.

**CN meio RPMI