



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DRIELI THOMASINI

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE INIBIDORES SELETIVOS DA ENZIMA
GUANINA FOSFORIBOSILTRANSFERASE DE *GIARDIA LAMBLIA* COMO
POSSÍVEIS CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIPARASITÁRIOS**

CAMPINAS

2019

DRIELI THOMASINI

**PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE INIBIDORES SELETIVOS DA ENZIMA
GUANINA FOSFORIBOSILTRANSFERASE DE *GIARDIA LAMBLIA* COMO
POSSÍVEIS CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIPARASITÁRIOS**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos para
a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área
de Ciências Farmacêuticas – Insumos
Farmacêuticos Naturais, Biotecnológicos e
Sintéticos**

Orientador: PROF. DR. DANIEL FABIO KAWANO

**ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA DRIELI
THOMASINI E ORIENTADA PELO PROF.
DR. DANIEL FABIO KAWANO**

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

T368p Thomasini, Drieli, 1992-
Planejamento e síntese de inibidores seletivos da enzima Guanina Fosforibosiltransferase de *Giardia lamblia* como possíveis candidatos à fármacos antiparasitários / Drieli Thomasini. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Daniel Fabio Kawano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Doenças parasitárias. 2. Giardia. 3. Química farmacêutica. I. Kawano, Daniel Fabio, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Design and synthesis of new selective inhibitors of Guanine Phosphoribosyltransferase from *Giardia lamblia* as potential antiparasitic drug candidates

Palavras-chave em inglês:

Parasitic diseases

Giardia

Pharmaceutical chemistry

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas: insumos farmacêuticos naturais, biotecnológicos e sintéticos

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Daniel Fabio Kawano [Orientador]

Selma Giorgio

Marcelo Lancellotti

Data de defesa: 29-08-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6698-4335>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0604420316025847>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Daniel Fabio Kawano (Orientador)

Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (FCF-UNICAMP)

Profª. Dra. Selma Giorgio (IB-UNICAMP)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida pela aluna **Drieli Thomasini**, aprovada pela Comissão Julgadora em 29 de agosto de 2019.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Meus agradecimentos à CAPES pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Agradeço primeiramente à Deus, por sempre me dar coragem, força e motivação para continuar e nunca desistir dos meus sonhos. Obrigada por ter colocado tantas pessoas especiais na minha vida, pois sozinha eu jamais teria conseguido.

À minha querida mãe Denise, que esteve presente em todos os momentos que precisei, dando apoio necessário e exercendo maravilhosamente seu papel de mãe por me dar tanto amor. Obrigada por todos os conselhos, por me encorajar, segurar a minha mão e me incentivar a mostrar o melhor de mim. Sinto-me orgulhosa e privilegiada por ter uma mãe tão especial. Sem você eu nada seria.

À minha família, por sempre se orgulharem de mim e confiarem no meu trabalho.

Ao meu namorado Bruno, por sempre me fazer acreditar que eu posso mais do que imagino e me inspira a querer ser mais que fui até hoje. Obrigada pelas palavras de incentivo e por permanecer ao meu lado.

Às minhas amigas Natália Barreto e Giovana Zieri por aguentarem todos os meus desabafos e por me fazerem sempre acreditar que eu posso, que eu consigo, que sou capaz. Vocês são incríveis e fazem parte dessa conquista.

Aos meus amigos do laboratório D-245 por toda ajuda, incentivo e pelos momentos divididos juntos; especialmente à Anna, por me ensinar tanto, dividir comigo as angústias, as alegrias e por se tornar uma verdadeira amiga que vou levar para a vida.

Obrigada Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida e Profa. Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira, por permitirem que esse trabalho fosse realizado e por todas as contribuições.

Agradeço principalmente ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano, pela dedicação, paciência e profissionalismo para que esse trabalho saísse como o planejado. Te admiro muito como professor, orientador e ser humano. Obrigada por sempre me motivar, mostrar o melhor caminho e confiar em mim até quando eu mesma não confio. Que Deus continue abençoando a sua vida e dê em dobro tudo o que fez por mim. Serei eternamente grata!

Gostaria de agradecer à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Instituto de Química, onde pude realizar este sonho que era a minha Dissertação de Mestrado.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, o meu sincero agradecimento.

RESUMO

Todos os anos, cerca de dois milhões de pessoas morrem por desidratação associada à diarreia, como resultado da falta de acesso à água de qualidade e à infraestrutura sanitária. Dentre as doenças diarreicas causadas por protozoários, *Giardia lamblia* tem se destacado ao responsável por 40% de todos os surtos mundiais registrados em quase 50 anos. A Organização Mundial da Saúde estima que as infecções causadas por *G. lamblia* sejam a doença protozoária intestinal mais frequentemente relatada em todo o mundo, podendo chegar a 200 milhões de indivíduos infectados por ano. Embora existam medicamentos efetivos para o tratamento da giardíase, a existência de linhagens resistentes à praticamente todos estes medicamentos reforça o fato de que a busca por novos fármacos contra o parasita deve ser um processo contínuo, de modo a sempre garantir que o arsenal terapêutico disponível seja suficiente para tratar mesmo os pacientes intrinsecamente mais resistentes. Ao contrário dos que ocorre nos seres humanos, protozoários parasitas como *G. lamblia* são incapazes da síntese *de novo* (total) de nucleotídeos purínicos e, portanto, dependem exclusivamente de mecanismos de captação e interconversão de purinas para a sua sobrevivência. Tal processo é mediado pela enzima Guanina Fosforibosiltransferase (GPRTase) e sua inibição resulta na redução de cerca de 90% da capacidade de replicação do parasita. Portanto a GPRTase de *G. lamblia* representa um alvo terapêutico atrativo para o planejamento de novos fármacos capazes de combater infestações causadas pelo parasita. Neste trabalho, após comparação do sítio ativo da GPRTase com a sua enzima homóloga em seres humanos, HGPRTase, foi possível identificar um pequeno bolso hidrofóbico que, se explorado através de interações específicas com os ligantes, poderia conferir uma inibição seletiva da GPRTase, reduzindo assim possíveis eventos adversos decorrentes da inibição da HGPRTase. Ao se empregar conceitos clássicos de química medicinal como extensão de estrutura, bioisosterismo e simplificação molecular, respaldados por simulações de docking molecular e predições dos perfis farmacocinéticos *in silico*, foi possível idealizar compostos potencialmente ativos e seletivos a partir da estrutura de um ligante não seletivo da GPRTase, o fosfato de imucilina G. Embora a rota sintética tenha sido padronizada pela obtenção de apenas um destes análogos, esta provavelmente poderá ser integralmente aplicada à síntese de outro análogo por conta da alta similaridade estrutural entre os dois compostos. Com relação à síntese dos dois compostos remanescentes, houve tempo hábil apenas para a síntese do primeiro intermediário sintético. Os trabalhos prosseguirão no grupo visando pôr à prova a hipótese originalmente proposta, de que tais compostos poderiam inibir seletivamente a GPRTase de *G. lamblia*, sem causar uma inibição significativa da HGPRTase humana.

ABSTRACT

Every year about 2 million people die due to dehydration associated with diarrhea, a consequence of the restricted access of poor populations to potable water and basic sanitary conditions. Concerning the waterborne diseases caused by parasitic protozoa, *Giardia lamblia* was responsible for 40% of the cases registered in almost 50 years, being giardiasis the most frequently reported protozoal intestinal infectious disease according to the World Health Organization. Although there are effective drugs for the treatment of giardiasis, development of resistant strains is a common issue for every drug employed for the treatment of giardiasis and, therefore, the search for new anti-giardiasis drugs should be a continuous process, in order to always ensure that the available therapeutic arsenal is enough to treat even the most resistant patients. Unlike host cells, *G. lamblia* trophozoites are unable to synthesize purine nucleotides via de novo synthesis and, therefore, they rely exclusively on mechanisms of capitation and interconversion of purines to replicate and survive. The enzyme Guanine Phosphoribosyl-transferase (GPRTase) plays a pivotal role in this process, since its inhibition reduced the ability of parasite replication in almost 90%. Therefore, the *G. lamblia* GPRTase may be considered a very attractive target for the development of new drugs against the parasite. In this work, we compared the active site of GPRTase with the homologous human enzyme, HGPRTase. Therefore, we could identify a small hydrophobic pocket that, if explored through specific interactions with ligands, would confer a selective GPRTase inhibition profile, possible reducing the incidence of adverse events due to the inhibition of HGPRTase. By employing classical concepts of medicinal chemistry such as structure extension, bioisosterism and molecular simplification, supported by molecular docking simulations and the prediction of in silico pharmacokinetic profiles, we could devise potentially active and selective compounds starting from the structure of a non-selective GPRTase ligand, the Immucillin G Phosphate. Although we were only able to successfully achieve the synthesis of a single compound, we can probably apply the same synthetic methods to obtain a second analog, considering the high degree of structural similarity between these two compounds. Regarding the synthesis of the two remaining compounds, we only could synthesize the first synthetic intermediate. Our research group will continue the efforts aiming to test our original hypothesis that such compounds could selectively inhibit the *G. lamblia* GPRTase enzyme, without a significant degree of inhibition of the human HGPRTase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVO.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	46
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS.....	57

1. INTRODUÇÃO

Melhorias no abastecimento de água, saneamento básico e higiene têm elevado consideravelmente os níveis de saúde e a expectativa de vida em países industrializados, embora doenças como diarreia, cólera e febre tifoide ainda permaneçam como uma das principais causas globais de mortalidade infantil. Estima-se que cerca de 880 milhões de pessoas não tenham acesso a água de qualidade, ou seja, água protegida de contaminação externa, particularmente de contaminação por matéria fecal. Todos os anos, cerca de dois milhões de pessoas morrem por desidratação associada à diarreia, como resultado da falta de acesso à água de qualidade e à infraestrutura sanitária (GRAHAM, 2011). Estima-se ainda que quase 20% do número total de mortes infantis estejam associadas à desidratação causada por diarreia (GRAHAM, 2011) e, mesmo quando não são fatais, quadros de diarreia persistente durante a primeira infância apresentam um profundo impacto no desenvolvimento físico e mental, podendo inclusive se traduzir em prejuízos na capacidade cognitiva e na produtividade destes indivíduos já na idade adulta (GUERRANT et al., 2002).

A diarreia é um sintoma de infecção causada por uma variedade de organismos como bactérias, vírus e protozoários. As doenças diarreicas podem ser transmitidas por água, comida ou diretamente de pessoa a pessoa via contaminação fecal-oral, sendo a sua ocorrência mais comum quando há falta de água limpa para beber, cozinhar ou para higiene básica (TULCHINSKY; VARAVIKOVA, 2009; OMS, 2010). As doenças transmitidas por água, também chamadas de doenças de veiculação hídrica, estão associadas principalmente a infecções por rotavírus, cepas patogênicas de *E. coli*, *Campylobacter jejuni* e protozoários parasitas (PALANIAPPAN et al., 2012).

Com relação às doenças de veiculação hídrica causadas por protozoários, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* se destacam, tendo sido responsáveis, respectivamente, por 40 e 50% dos surtos mundiais registrados entre 1954 e 2001 (KARANIS; KOURENTI; SMITH, 2007). Em função do papel preponderante destes parasitas no desenvolvimento de quadros de diarreia e de transtorno nutricional nas populações dos vários países ao redor do globo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu em 2004 as infecções causadas por *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* como parte efetiva de suas iniciativas para o combate às doenças negligenciadas (SAVIOLI; SMITH; THOMPSON, 2006).

Doenças negligenciadas são enfermidades infecciosas que, principalmente, mas não exclusivamente, afetam populações pobres dos países em desenvolvimento, onde a falta de saneamento básico e de acesso à saúde fomentam sua transmissão e a proliferação de seus vetores. Embora haja um grande interesse social no desenvolvimento de novos fármacos para tratar ou prevenir essas doenças, poucas empresas farmacêuticas se dedicam à pesquisa e ao desenvolvimento de fármacos para atender a este mercado quando não há qualquer tipo de incentivo governamental que garanta um retorno comercial mínimo sobre seus investimentos (COHEN; DIBNER; WILSON, 2010). Neste sentido, as universidades desempenham um papel fundamental na pesquisa, no desenvolvimento e na transferência da tecnologia associada aos fármacos capazes de tratar ou prevenir doenças negligenciadas, como as doenças diarreicas causadas por protozoários parasitas (CHOKSHI, 2006).

A OMS estima que as infecções causadas por *Giardia lamblia* sejam a doença protozoária intestinal mais frequentemente relatada em todo o mundo, podendo chegar a 200 milhões de indivíduos infectados por ano. A doença se distribui geograficamente por todo o globo, dos trópicos ao ártico, e tende a ser mais comum em crianças do que em adultos (USA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999). A giardíase, doença infecciosa intestinal causada pelo protozoário flagelado *Giardia lamblia* (também chamados de *Giardia intestinalis* e *Giardia duodenalis*) se caracteriza por perda de apetite, diarreia, fezes moles ou líquidas, cólicas, náuseas e excesso de gases. Os sintomas normalmente aumentam e diminuem durante a evolução da doença e mesmo após o tratamento reinfecções podem ocorrer uma vez que a giardíase não confere imunidade (MCKINNEY, 2010).

A presença de *G. lamblia* no lúmen intestinal provoca inflamação, irritação e destruição tecidual, fato que resulta no aumento da velocidade do trânsito intestinal, má absorção dos nutrientes, desidratação, perda de peso e fadiga (MCKINNEY, 2010). Nos casos da persistência crônica do parasita, deficiências na absorção de Vitamina A, B₁₂ e intolerância à lactose têm sido relatadas (CORDINGLEY; CRAWFORD, 1986; RANA; BHASIN; VINAYAK, 2005; QUIHUI-COTA et al., 2008). A giardíase pode ser fatal em pacientes com hipogamaglobulinemia e também pode agravar doenças como AIDS e fibrose cística (MCKINNEY, 2010).

Do ponto de vista morfológico, *G. lamblia* apresenta duas formas: trofozoíto e cisto. O cisto é a forma infecciosa, normalmente ingerida junto à água contaminada. Apenas 10 cistos são necessários para se iniciar uma infestação. A transmissão por água é facilitada devido à relativa resistência do cisto a cloração, bem como à sua capacidade de sobreviver em água fresca por várias semanas. Uma vez em contato com o ácido gástrico, ocorre o excistamento do parasita, um processo mediado por cisteína proteases que resulta na liberação dos trofozoítos. Estes trofozoítos infectam o duodeno e a parte superior do intestino delgado, locais que apresentam um pH alcalino favorável à sua manutenção, e irão promover os quadros de inflamação, irritação e destruição tecidual que culminarão nos sintomas clínicos da giardíase. À medida que os trofozoítos se aproximam do cólon, a diminuição do pH inicia o processo de encistamento, permitindo que a forma cística do parasita alcance o ambiente para a contaminação de novos indivíduos (GARDNER; HILL, 2001).

Giardia lamblia é um microrganismo unicelular, flagelado e típico eucariótico, pois possui núcleo, membrana celular, citoesqueleto e endomembrana, mas não possui outras organelas como peroxissomos e nucléolos. Além disso, *G. lamblia* é anaeróbico e, portanto, não possui mitocôndrias ou quaisquer componentes da fosforilação oxidativa. Os trofozoítos desse microrganismo têm forma de pera, possui quatro pares de flagelos, dois núcleos simétricos em relação ao eixo longo e um disco ventral, responsável pela sua fixação na parede intestinal do hospedeiro. No citoplasma encontra-se os vacúolos lisossômicos e os grânulos ribossômicos e de glicogênio. Na sua forma cística, é possível observar os complexos de Golgi (ADAM, 2001).

A base para o tratamento da giardíase se estabeleceu na década de 1940 com a introdução da quinacrina (**Figura 1**). Após a segunda Guerra Mundial, sua eficácia contra *G. lamblia* era superior a 90%; porém, com o aparecimento de linhagens resistentes, bem como o desenvolvimento de fármacos com um perfil de segurança mais favorável, sua produção foi interrompida nos EUA no início da década de 1990. Acredita-se que a quinacrina atue intercalando-se ao DNA (com preferência por regiões ricas em adenina ligadas a timina) inibindo assim a biossíntese de RNA e de proteínas em procariontes. A toxicidade relativa da quinacrina sobre *G. lamblia* se deve à maior velocidade de absorção do fármaco pelo parasita do que por células humanas, sendo que os casos de resistência se devem exatamente a uma redução na captação do fármaco pelo protozoário (GARDNER; HILL, 2001; MÜLLER; HEMPHILL; MÜLLER, 2011).

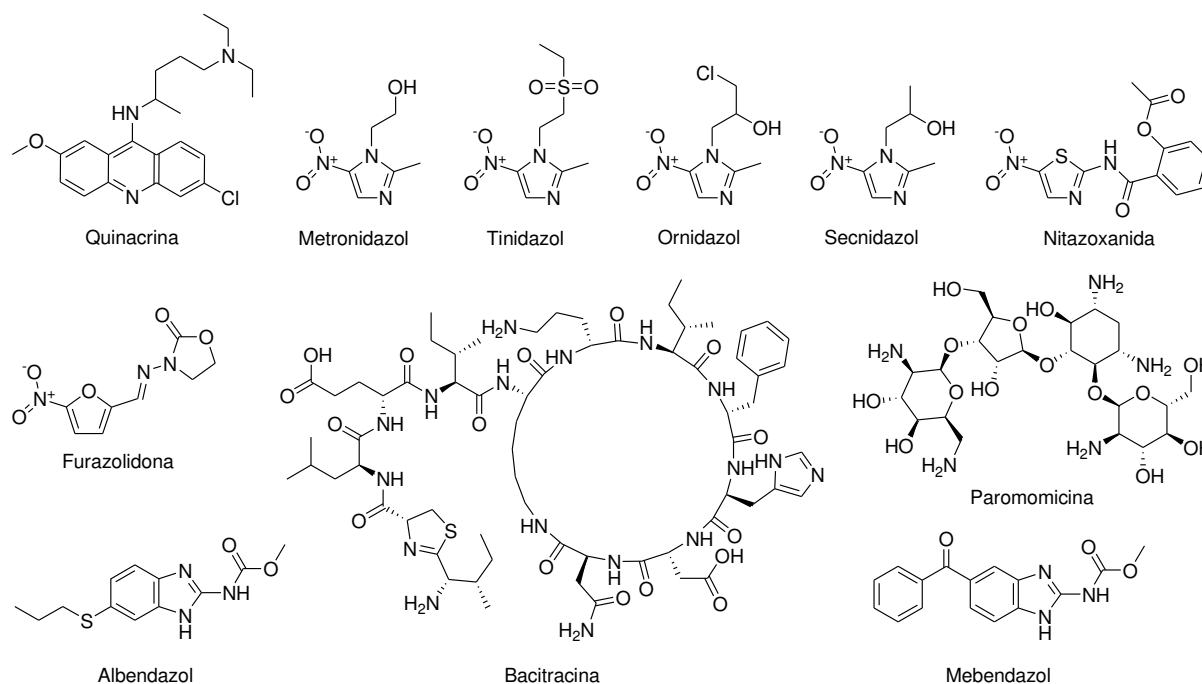


Figura 1. Estruturas químicas dos principais fármacos empregados no tratamento da giardíase.

A segunda classe de compostos a serem utilizados para o tratamento da giardíase, os nitroimidazóis, foi descoberta em 1955 e inclui fármacos como o metronidazol, tinidazol, ornidazol e secnidazol (**Figura 1**). Desde sua descoberta, metronidazol e demais nitroimidazóis são a principal ferramenta terapêutica no tratamento de infecções causadas por *G. lamblia*. De acordo com a teoria mais aceita, o metronidazol (um pró-fármaco) é reduzido a um radical nitro por elétrons provenientes da enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductase (PFOR), enzima que não está presente em células de eucariotos superiores. Este metronidazol reduzido atuaria como um aceptor terminal de elétrons e se ligaria covalentemente ao DNA, causando a perda da estrutura helicoidal, ruptura das hélices e subsequente morte do trofozoíto. A resistência aos nitroimidazóis correlaciona com a diminuição da atividade da PFOR, necessária para sua bioativação redutiva (GARDNER; HILL, 2001; MÜLLER; HEMPHILL; MÜLLER, 2011).

Outros fármacos utilizados para o tratamento da giardíase incluem nitazoxanida, furazolidona, benzimidazóis, paromomicina e bacitracina de zinco (**Figura 1**). A furazolidona é um dos representantes da classe dos nitrofuranos, compostos classicamente empregados como antibióticos e antimicrobianos. Como o metronidazol, o fármaco também sofre ativação redutiva no trofozoíto, porém esta redução ocorre através de uma NADH oxidase e não da PFOR. O resultado final desta bioativação também resulta em danos ao DNA e os casos de

resistência estão relacionados com a diminuição da entrada do fármaco no trofozoíto ou ao aumento dos níveis de cisteína oxidases/redutases, que são capazes de proteger o parasita contra os efeitos causados pelos radicais tóxicos (GARDNER; HILL, 2001). Já a nitazoxanida, um nitrotiazól eficaz no tratamento de uma gama de infecções parasitárias, incluindo a giardíase, atua de modo semelhante ao metronidazol sendo bioativada via PFOR, embora outros alvos, como as nitroredutases (GINR2), também tenham sido apontados para este fármaco (MÜLLER; SCHILDKNECHT; MÜLLER, 2013).

Os benzimidazóis, albendazol e mebendazol, exercem seu efeito tóxico através de interação com a β -tubulina do parasita, inibindo a polimerização do seu citoesqueleto. Resistência aos benzimidazóis ocorre em função de mudanças no citoesqueleto do parasita. Já a paromomicina, um aminoglicosídeo, inibe a síntese proteica de *G. lamblia* através da ligação às subunidades 50S e 30S ribossomais, levando à leitura incorreta dos códons de RNA mensageiro. Entretanto, a suscetibilidade do parasita à paromomicina é menor do que aos nitroimidazóis, quinacrina ou furazolidona. Outro antibiótico, a bacitracina, representa uma alternativa para o tratamento de giardíase pois impede a desfosforilação de um fosfolípido necessário para a síntese da membrana celular. Contudo, o uso prolongado por via oral deste antibiótico está associado a casos de nefrotoxicidade e distúrbios gastrintestinais (GARDNER; HILL, 2001).

Um problema comum a praticamente todos os medicamentos empregados para o tratamento da giardíase diz respeito ao surgimento de linhagens resistentes. Populações de *Giardia* parecem ter mecanismos muito flexíveis para responder às alterações do meio ambiente, tais como a pressão seletiva imposta por fármacos. A ocorrência de mutações no genoma desse parasita e a seleção de fenótipos diferentes, resulta em subpopulações com diferentes padrões de expressão gênica, possibilitando que o protozoário evada a resposta imune do hospedeiro. Tendo isso em vista, considera-se a variação antigênica como o principal mecanismo relacionado à resistência aos tratamentos, sendo que existem hipóteses de que esse problema poderia ser solucionado através de estratégia de epigenética. Os mecanismos relacionados à resistência variam de fármaco para fármaco, mas em geral estão associados a mutações no alvo terapêutico ou à redução da captação dos fármacos pelos trofozoítos que, em ambos os casos, podem conduzir à ineficácia terapêutica. Pacientes que são refratários à monoterapia podem ser tratados apenas pela associação de dois ou mais fármacos, como a combinação de metronidazol com quinacrina (MÜLLER; HEMPHILL; MÜLLER, 2011; NASH et al., 2001).

Neste contexto, a busca por novos fármacos capazes de debelar infecções causadas por *G. lamblia* deve ser um processo contínuo, de modo a sempre permitir que o arsenal terapêutico disponível seja suficiente para tratar mesmo os pacientes intrinsecamente mais difíceis, como os imunocomprometidos (NASH et al., 2001). Idealmente, os candidatos a fármacos antiparasitários devem se ligar a uma enzima ou receptor específico do parasita (ou seja, que não possua uma proteína correspondente no hospedeiro), e que esteja relacionada a funções celulares vitais à sua sobrevivência. Este último aspecto é crucial para a viabilidade do processo pois estima-se que cerca de 60% dos projetos relacionados à descoberta de novos fármacos falhem devido ao fato do alvo biológico escolhido não participar diretamente da patologia que se pretende tratar, de modo que a modulação destes alvos não garantirá a eficácia do tratamento farmacológico (CHENG et al., 2007).

Com recursos financeiros tão limitados para o desenvolvimento de fármacos na área de doenças negligenciadas, a confirmação (validação) da importância terapêutica destes alvos logo no início do processo permite que os recursos disponíveis sejam empregados de modo mais produtivo. Talvez a forma mais conclusiva de se validar um alvo terapêutico seja através da produção de parasitas *knockout*, nos quais a expressão da proteína de interesse é suprimida para que se possa avaliar a verdadeira importância do alvo na viabilidade do organismo (JACKSON; PHILLIPS, 2002).

Dentre os possíveis alvos que podem ser empregados para o tratamento das infecções causadas por *G. lamblia*, a enzima guanina Fosforibosiltransferase (GPRTase) chamou a nossa atenção. Embora a enzima tenha sido inicialmente isolada a partir de extratos de *G. lamblia* (ALDRITT; WANG, 1986), não tendo sido descrita a sua exata localização celular, acredita-se que se trate de uma enzima citoplasmática solúvel, conforme descrito para a enzima homóloga humana (STOUT; CASKEY, 1985).

A GPRTase é uma enzima essencial para a produção de nucleotídeos no parasita e, portanto, vital para a síntese do DNA e RNA necessários à sua replicação e sobrevivência. A construção de trofozoítos *knockouts* para esta enzima pela técnica de RNA antisense mostrou que os parasitas resultantes apresentaram uma redução na capacidade de replicação de 80 a 90%, destacando a possibilidade de seu uso como alvo no desenvolvimento de novos fármacos anti-giardíase (MUNAGALA; WANG, 2002).

O papel central que a GPRTase representa na sobrevivência de *G. lamblia* se deve ao fato de que, ao contrário do que ocorre nos seres humanos, os protozoários parasitas são incapazes da síntese *de novo* de nucleotídeos purínicos e, portanto, dependem exclusivamente de mecanismos de captação e interconversão de purinas para a sua sobrevivência. No caso específico da *Giardia*, o parasita apresenta uma especificidade absoluta por guanina (não sendo capaz de utilizar hipoxantina, inosina ou xantina para a síntese de nucleotídeos), a qual deve ser obtida a partir da hidrólise de nucleosídeos captados do ambiente (MEHLHORN, 2001). O reaproveitamento das bases nitrogenadas no parasita ocorre pela hidrólise dos nucleosídeos pela enzima guanosina hidrolase, seguida da formação do monofosfato de guanosina pela GPRTase através da transferência do grupo fosforribosil do 5-fosfo- α -D-ribosil 1-pirofosfato para a guanina, processo dependente de íons de Mg^{2+} presentes no sítio catalítico da enzima (**Figura 2**) (SHI et al., 2000; ADAM, 2001).

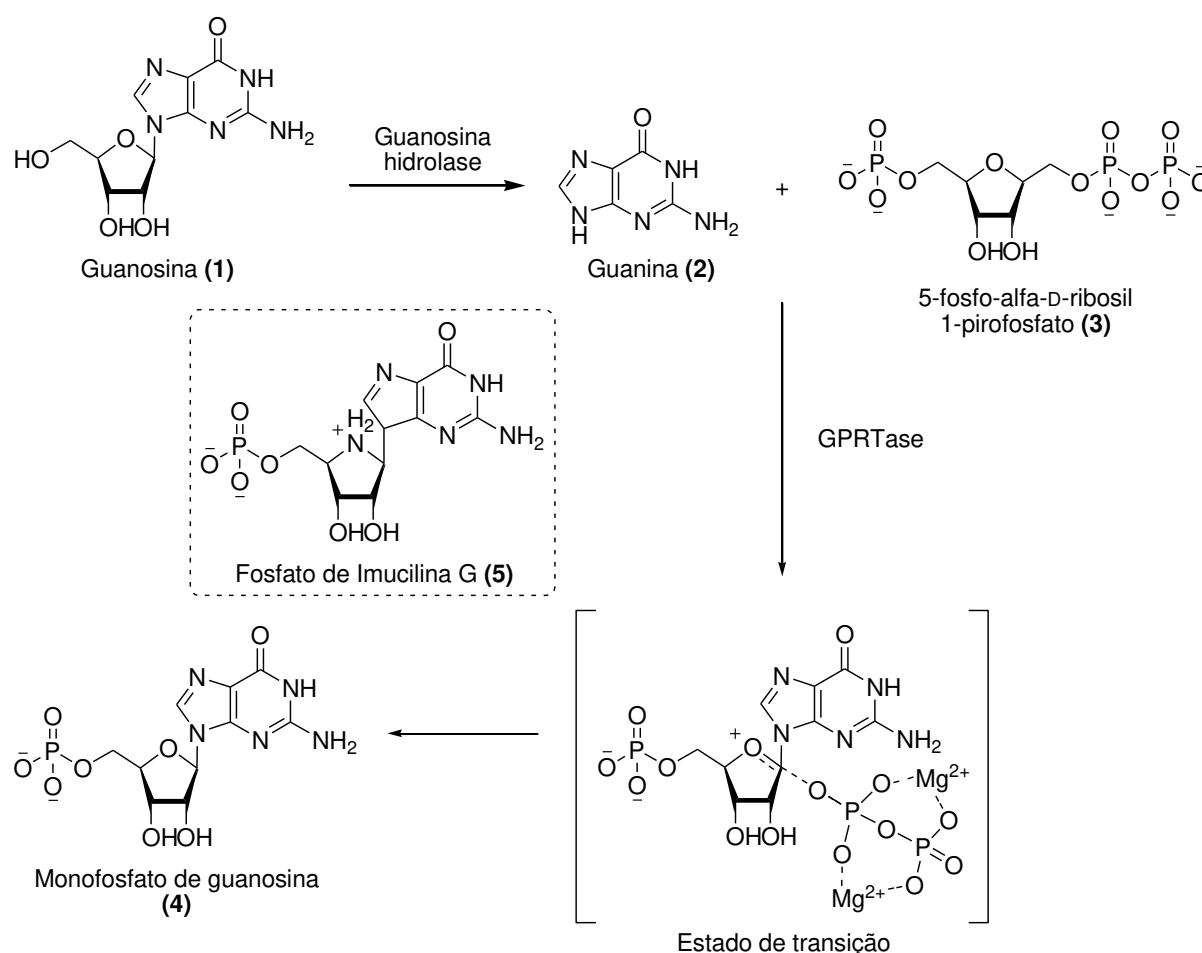


Figura 2. Síntese do monofosfato de guanosina pelas enzimas guanosina hidrolase e guanina fosforibosiltransferase (GPRTase) de *Giardia lamblia*. Os íons de magnésio no estado de transição fazem parte do sítio ativo da GPRTase. Destaca-se ainda a semelhança estrutural entre o inibidor da GPRTase fosfato de imucilina G e o estado de transição. Adaptado de Shi et al. (2000) e Adam (2001).

Embora os seres humanos sejam capazes de realizar a síntese *de novo* (total) de nucleotídeos purínicos (na qual o anel de purina é produzido a partir de diferentes fontes como glicina, ácido aspártico, glutamina e CO_2), parte das purinas necessárias para atender os requisitos totais do organismo vem da reincorporação (reciclagem) destas bases nos nucleotídeos, a qual é promovida pela enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRTase) (BHAGAVAN; HA, 2015). A HGPRTase humana catalisa a formação de monofosfato de inosina e monofosfato de guanosina a partir de hipoxantina e guanina, respectivamente, sendo que sua deficiência parcial resulta na superprodução de ácido úrico, a qual se traduz clinicamente como quadros precoces de gota e nefrolitíase. A ausência completa da ação desta enzima promove a chamada síndrome de Lesch-Nyhan, que se caracteriza por elevados níveis de ácido úrico no sangue e urina, além de disfunções motoras e neurológicas severas (DAVIDSON; PALELLA; KELLEY, 1988).

Apesar da identidade sequencial entre a GPRTase e HGPRTase ser de apenas 23%, os aminoácidos envolvidos na ligação do substrato e catálise são altamente conservados. Neste sentido, embora inibidores potentes da GPRTase como o fosfato de imucilina G ($K_i = 60 \text{ nM}$) tenham sido planejados com base em seu estado de transição (**Figura 2**), estes também apresentam alta afinidade pela HGPRTase ($K_i = 56 \text{ nM}$ para o fosfato de imucilina G), sendo, assim, de pouca utilidade terapêutica (LI et al., 1999; SHI et al., 2000). Portanto, uma possível inibição farmacológica da atividade desta enzima poderia resultar em sintomas semelhantes aos observados na síndrome de Lesch-Nyhan, fato que ressalta a importância de se planejar inibidores seletivos para a GPRTase de *G. lamblia*, com a menor afinidade possível pela enzima HGPRTase humana.

Neste sentido, Aronov e col. (2001) identificaram inibidores da GPRTase de *G. lamblia* realizando uma triagem virtual em base de dados contendo derivados de ftalimidas, dentre as quais 16 foram sintetizadas e 7 apresentaram valores de IC_{50} para a inibição da GPRTase de *G. lamblia* inferiores a $100 \mu\text{M}$ (**Figura 3**). Alguns destes compostos foram também avaliados frente à capacidade de inibição da HGPRTase humana e alcançaram níveis de seletividade para a GPRTase de *G. lamblia* de até sete vezes, mostrando que seria possível explorar as diferenças estruturais entre as duas enzimas para desenvolver inibidores seletivos da GPRTase (ARONOV et al., 2001).

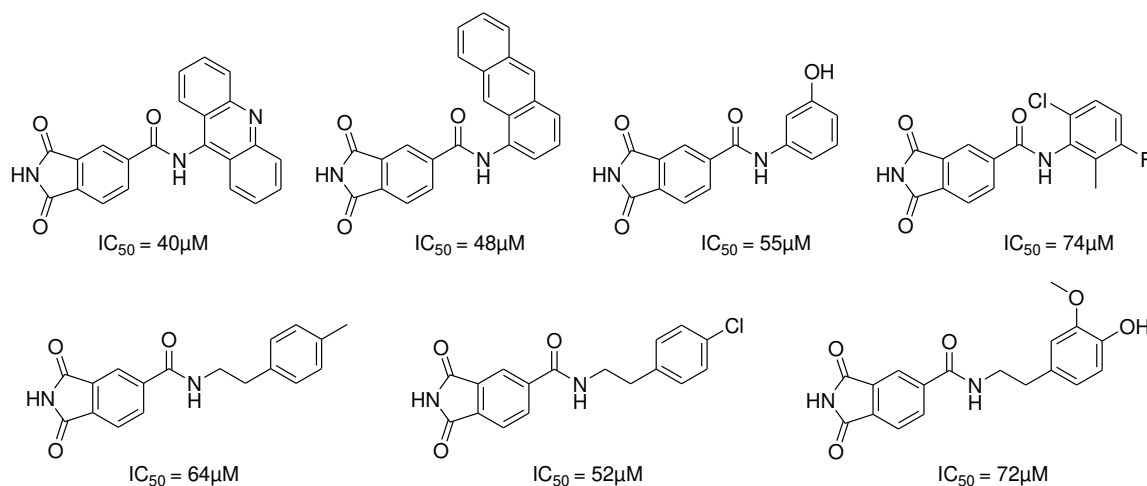


Figura 3. Estruturas químicas dos inibidores da GPRTase de *G. lamblia* por Aronov e col. (2001).

Neste contexto, este trabalho descreve o uso de conceitos clássicos de química medicinal, como extensão de cadeia, bioisosterismo e simplificação estrutural (PATRICK; SPENCER, 2009), respaldados por simulações de *docking* molecular e previsões in silico de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, para guiar a síntese de inibidores seletivos da GPRTase de *G. lamblia*. A descoberta de inibidores seletivos desta enzima consistiria assim em um passo importante no desenvolvimento de novos fármacos capazes de combater linhagens de *G. lamblia* resistentes à quimioterapia antiparasitária tradicional.

2. OBJETIVO

Desenvolver inibidores da enzima Guanina Fosforibosiltransferase (GPRTase) de *Giardia lamblia* que possuam ação seletiva frente a enzima do parasita, bem como perfis farmacocinéticos e toxicológicos adequados para serem empregados como protótipos no desenvolvimento de novos fármacos veiculados por via oral no tratamento da giardíase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. *Aparelhagem analítica*

Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e DEPT-135 foram obtidos nos espectrômetros Bruker Avance 400 e Bruker Avance 600 operando na frequência 400 e 600 MHz, pertencente ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Os dados foram adquiridos conforme os parâmetros fornecidos pelo equipamento e processados no software MestReNova 6.0.2. Os valores de deslocamento químico foram expressos em partes por milhão (ppm), utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os solventes utilizados nas análises foram CDCl_3 , CD_3OD e DMSO-d_6 . As constantes de acoplamento estão representadas pela letra J e expressas em Hz. As notações utilizadas para a multiplicidade dos sinais nos espectros de RMN ^1H foram: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), quint (quintuplete) e m (multiplete).

3.1.2. *Solventes, reagentes e outros materiais*

Os solventes e reagentes comerciais foram convenientemente secos e purificados conforme métodos descritos (ARMAREGO; CHAI, 2003). Cromatografias em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram realizadas utilizando placas de cromatofolhas sílica-gel 60 F_{254} da MERCK®. A revelação das placas foi efetuada empregando irradiações de UV de 245 e 366nm, vapores de sublimação de iodo e com solução reveladora de etanol/vanilina/ácido sulfúrico. As Cromatografias em Coluna Clássica (CCC) foram realizadas utilizando Alumina 150 mesh Sigma-Aldrich e sílica gel 60 (0.040-0.063 mm) MERCK®.

3.2. Métodos

3.2.1. *Síntese do ácido 4-(Bromometil)benzenossulfônico (8)*

A uma solução de cloreto de 4-(Bromometil)benzenossulfonila (108 mg, 0,4 mmol) em 1,4-dioxano (3 mL) foi adicionado HCl aquoso (10%, 3 mL) e a mistura reacional foi agitada à 40 °C por 4 h (KULAGOWSKI; EDWARDS, 2009). O solvente foi removido e o resíduo foi utilizado na etapa subsequente de síntese sem purificações adicionais. Por não estar o composto completamente puro, o rendimento desta etapa não pode ser calculado.

3.2.2. Síntese do 4-(Bromometil)benzenosulfonato de sódio (8s)

Cloreto de 4-(Bromometil)benzenossulfonila (100 mg, 0,4 mmol, 1 equiv.) foi dissolvido em etanol (1 ml) e água (10 mg, 0,42 mmol, 1,05 equiv.) e a mistura reacional foi submetida a agitação em temperatura de refluxo de etanol por 3 h. O solvente foi removido e o resíduo dissolvido em 0,5 ml de água, seguido da adição de NaOH (1 equiv.) e a solução levada à secura por liofilização (GIRARD-LAURIAULT; BOYD, 2002).

3.2.3. Síntese de 3-[(2-amino-9H-purin-6-il)amino]propan-1-ol (11b)

A uma solução de 2-Amino-6-cloropurina (169 mg, 1 mmol, 1 equiv.) em DMF (1 mL), foram adicionados 1,2 mmol de *N,N*-Diisopropiletilamina (DIPEA, 155 mg, 209 µl) e 5 mmol de 3-Aminopropan-1-ol (375 mg). A mistura reacional foi mantida sob agitação em atmosfera inerte a 80 °C por 1h, quando solvente reacional foi removido, sendo o sólido remanescente dissolvido em diclorometano e as impurezas precipitadas em temperatura ambiente *overnight* para fornecer o produto puro com rendimento de 41% (BOËNS et al., 2013). RMN de ¹H (250 MHz, CH₃OD) δ 8,01 (s, 1H), 3,64 – 3,55 (m, 2H), 3,32 – 3,29 (m, 3H), 1,80 – 1,63 (m, 2H).

3.2.4. Síntese do sal sódico do ácido 4-[(2-amino-6-[(3-hidróxipropil)amino]-9H-purin-9-il)metil]benzeno-1-sulfônico (6b)

A uma solução de **11b** (0,8 mmol, 166 mg) em DMF (1 mL), foram adicionados carbonato de potássio (0,6 mmol, 83 mg) e o ácido 4-(Bromometil)benzenosulfônico (**8**) (0,6 mmol, 150 mg). Após agitação em atmosfera inerte a uma temperatura de 65 °C por 40 horas, a suspensão foi filtrada para a remoção do carbonato de potássio, o solvente foi removido (BLIMAN et al., 2009). O bruto reacional foi então purificado por cromatografia em coluna clássica empregando alumina como fase estacionária e uma mistura de diclorometano e metanol (7:3, v/v) como fase móvel. Após recristalização em éter etílico, foi possível isolar o produto com um rendimento de 1,5%, o qual foi submetido à análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H). ¹H NMR (250 MHz, MeOD) δ 7,81 (s, 1H), 7,77 (dd, 2H), 7,27 (dd, 2H), 4,53 – 4,44 (m, 2H), 3,53 (dt, 2H), 3,41 (s, 2H), 1,33 – 1,10 (m, 2H).

3.2.5. Síntese do sal sódico do ácido 4-{2-amino-6-[(3-hidróxipropil)amino]-9H-purin-9-il}metil)benzeno-1-sulfônico (6b)

A uma solução de 11b (0,8 mmol, 166 mg) em DMF (1 mL), foram adicionados carbonato de potássio (0,6 mmol, 83 mg) e o ácido 4-(Bromometil)benzenosulfônico (8) (0,6 mmol, 150 mg). Após agitação em atmosfera inerte a uma temperatura de 65°C por 40 horas, a suspensão foi filtrada para a remoção do carbonato de potássio, o solvente foi removido (BLIMAN et al., 2009). O bruto reacional foi então purificado por cromatografia em coluna clássica empregando alumina como fase estacionária e uma mistura de diclorometano e metanol (7:3, v/v) como fase móvel. Após recristalização em éter etílico, foi possível isolar o produto com um rendimento de 14%, o qual foi submetido à análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H), da qual aguardamos o resultado no presente momento.

3.2.6. Síntese do intermediário sintético (2R)-3-[(2-amino-9H-purin-6-il)amino]propano-1,2-diol (11d)

A uma solução de 2-Amino-6-cloropurina (169 mg, 1 mmol, 1 equiv.) em DMF (1 mL), foram adicionados 1,2 mmol de *N,N*-Diisopropiletilamina (DIPEA, 155 mg, 209 μl) e 5 mmol de 3-Aminopropan-1-ol (375 mg). A mistura reacional foi mantida sob agitação em atmosfera inerte a 80 °C por 1h, quando solvente reacional foi removido, o sólido remanescente dissolvido em acetonitrila, sendo as impurezas precipitadas em temperatura ambiente *overnight* para fornecer o produto puro com rendimento de 13,5 % (BOËNS et al., 2013). RMN de ^1H (250 MHz, CH_3OD) δ 8,08 (s, 1H), 3,76 – 3,60 (m, 2H), 3,55 – 3,48 (m, 1H), 3,34 – 3,14 (m, 2H).

3.2.7. Análises do modo de ligação dos compostos 6a-h por docking molecular

A abordagem de *docking* molecular pode ser usada para modelar a interação entre uma molécula pequena (ligante) e uma proteína em nível atômico, o que permite caracterizar o comportamento de moléculas pequenas no sítio de ligação de proteínas-alvo, bem como para elucidar seus processos bioquímicos fundamentais. Neste sentido, os compostos planejados foram submetidos à triagem por *docking* flexível utilizando a GPRTase de *G. lamblia* (código PDB 1DQN) e HGPRTase (código PDB 1BZY) no *software* GOLD (http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/). Programas de *docking* utilizam os

chamados algoritmos de amostragem, os quais permitem ao *software* testar apenas as conformações mais importantes de um ligante no sítio ativo do alvo molecular em lugar de analisar todas as conformações possíveis, o que seria muito demorado e demandaria um enorme custo computacional (MENG et al., 2011).

No caso do GOLD estes algoritmos de amostragem são baseados nos chamados algoritmos genéticos, os quais se baseiam na teoria da evolução de Darwin. Neste sistema, os diferentes graus de liberdade do ligante são codificados como números binários chamados “genes”. Estes genes são agrupados para formar um “cromossomo” que representa uma pose de um dado ligante no sítio ativo da proteína. Mutações e *crossover* entre cromossomos são realizadas para gerar novos genes e uma função de escore estabelece quais seriam os cromossomos mais aptos a sobreviver enquanto os demais seriam descartados. Em outras palavras, esta função de escore determina quais as conformações do ligante seriam mais prováveis dentro do sítio ativo da proteína (KROEMER, 2007; MENG et al., 2011).

Antes de se iniciar a docagem molecular propriamente dita, os parâmetros ótimos foram selecionados através da comparação nas diferentes corridas da conformação, posição e orientação (as quais no conjunto são conhecidas como pose) do ligante docado com a pose correspondente do ligante co-cristalizado com o alvo farmacológico. Este processo, conhecido como redocagem, é considerado um requisito mínimo para determinar se os parâmetros de docagem selecionados são apropriados para a simulação com um determinado alvo ou não. Tal análise é efetuada pela comparação dos valores de desvio quadráticos médios (RMSD, do inglês *Root-Mean-Square Deviation*), uma medida da distância média entre os átomos do ligante cristalográfico de referência e do ligante docado. Para análise, utilizou-se o valor de RMSD de 2 Å como limite já que este é amplamente reconhecido como padrão na análise dos estudos de redocagem (AROOJ et al., 2013).

Neste sentido, os átomos de hidrogênio faltantes foram adicionados ao modelo e cofatores e moléculas de água removidos. Os melhores resultados na redocagem foram alcançados (RMSD = 0,43 Å para a GPRTase e 0,45 Å para a HGPRTase) quando os algoritmos genéticos foram aplicados com 100% de eficiência e a flexibilidade de eficiência de busca foi ajustada para 100% (padrão). A esfera de docagem foi definida num raio de 6 Å a partir do centroide do ligante cristalográfico, fosfato de imucilina G, e a função de escore usada no ranqueamento das poses foi a GoldScore (VERDONK et al., 2003).

3.2.8. Predições *in silico* de propriedades farmacocinéticas dos compostos 6a-d

Estima-se que as questões relacionadas à toxicidade e a um perfil farmacocinético inadequado sejam responsáveis por aproximadamente metade de todos os casos de falha no desenvolvimento de um fármaco. Portanto, o uso de ferramentas *in silico* para a predição das propriedades farmacocinéticas de um composto pode auxiliar na escolha de protótipos que conduzam ao desenvolvimento de fármacos seguros, efetivos e com características adequadas para serem veiculados por via oral (VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

Neste contexto, os compostos planejados tiveram suas propriedades farmacocinéticas avaliadas no programa VolSurf+ (http://www.moldiscovery.com/soft_vsplus.php). VolSurf cria modelos preditivos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) dos compostos calculando os descritores relevantes para estas propriedades e empregando análises estatísticas para a construção dos modelos. Neste processo, o programa calcula os campos de interação molecular 3-D para cada substância e emprega métodos de processamento de imagem para convertê-los em descritores moleculares simples, os quais são mais fáceis de se entender e interpretar (**Figura 4**) (CRUCIANI et al., 2000; CRUCIANI; PASTOR; GUBA, 2000; CRIVORI et al., 2000).

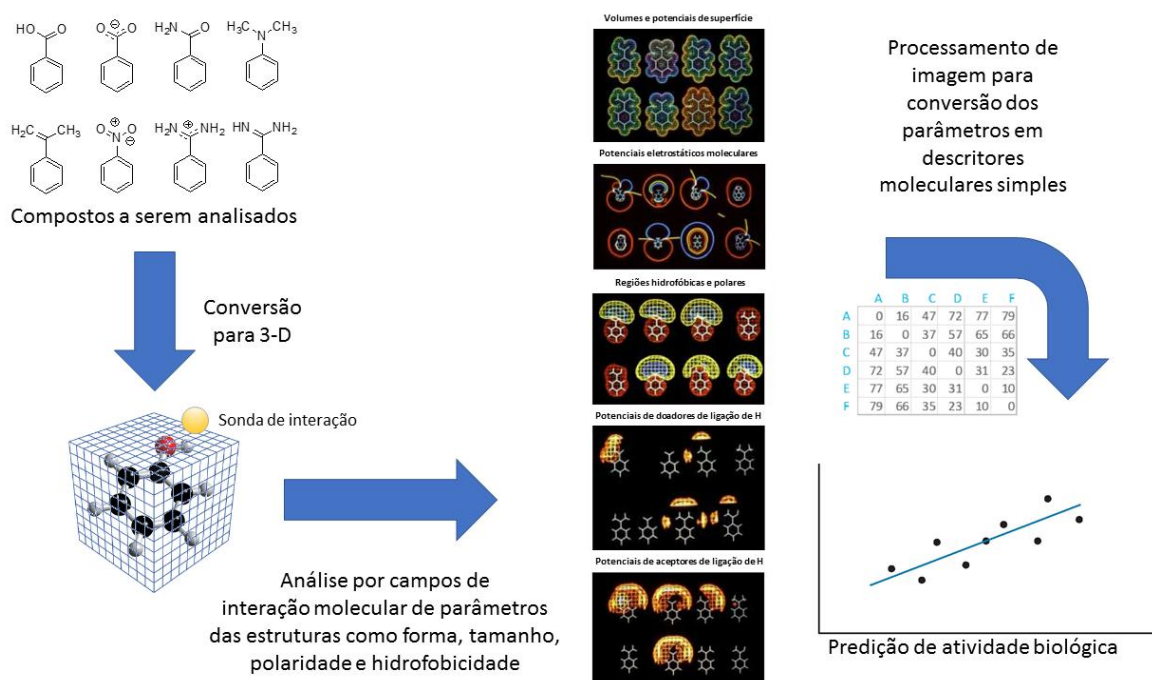


Figura 4. Representação do método de predição de atividades biológicas pelo programa VolSurf+. Figura da autora.

Estes descritores caracterizam quantitativamente a forma, o tamanho, a polaridade e a hidrofobicidade das moléculas, bem como a relação entre eles. Na sequência, métodos estatísticos multivariados permitem a criação dos modelos que relacionam os descritores com diferentes propriedades biológicas. Tais modelos se propõem a prever a solubilidade de um composto, sua absorção intestinal passiva, permeação pela barreira hematoencefálica, ligação às proteínas plasmáticas, volume de distribuição e metabolismo. Estes modelos foram desenvolvidos a partir de dados experimentais coletados de ensaios *in vitro* que simulam o comportamento dos fármacos *in vivo* (CRUCIANI et al., 2000; CRUCIANI; PASTOR; GUBA, 2000; CRIVORI et al., 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Planejamento de inibidores seletivos da GPRTase de *Giardia lamblia*

O desenho de inibidores potencialmente seletivos da GPRTase de *G. lamblia* foi iniciado pela comparação dos aminoácidos do sítio catalítico nos modelos 3-D da GPRTase do parasita (código PDB 1DQN) e da HGPRTase humana (código PDB 1BZY). Para tanto, os complexos foram analisados e comparados de forma que regiões de baixa conservação estrutural pudessem ser identificadas para serem posteriormente exploradas em interações específicas entre os resíduos da GPRTase e os ligantes planejados. A partir da análise das interações realizadas entre os aminoácidos da GPRTase (**Figura 5, A**) e HGPRTase (**Figura 5, B**) com o fosfato de imucilina G, várias semelhanças foram observadas.

Com relação ao núcleo purínico do inibidor, na GPRTase este realiza ligações de hidrogênio com a Leu¹⁸¹; interações do tipo π - π com Trp¹⁸⁰ e ligação de hidrogênio (íon-dipolo) com Asp¹²⁹; interações que são correspondentes na HGPRTase a ligações de H com a Lis¹⁶⁵, Val¹⁸⁷ e Asp¹⁹³, interações do tipo π - π com Phe¹⁸⁶ e ligação de H (íon-dipolo) com Asp¹³⁷. Já sobre as interações realizadas com o iminoaçúcar, além de coordenações com os íons de Mg²⁺ nas duas enzimas, observa-se uma ligação de H com a Tyr¹²⁷ para GPRTase, que equivale a ligações de H com Asp¹³⁴ e Glu¹³³ na HGPRTase. Já em relação ao grupo fosfato, somente interações por ligação de H são observadas, com os resíduos Asp¹²⁹, Gly¹³¹, Thr¹³³ e Ser¹³⁰ na GPRTase, e com Asp¹³⁷, Gly¹³⁹, Tyr¹⁰⁴, Thr¹³⁸ e Thr¹⁴¹ na HGPRTase.

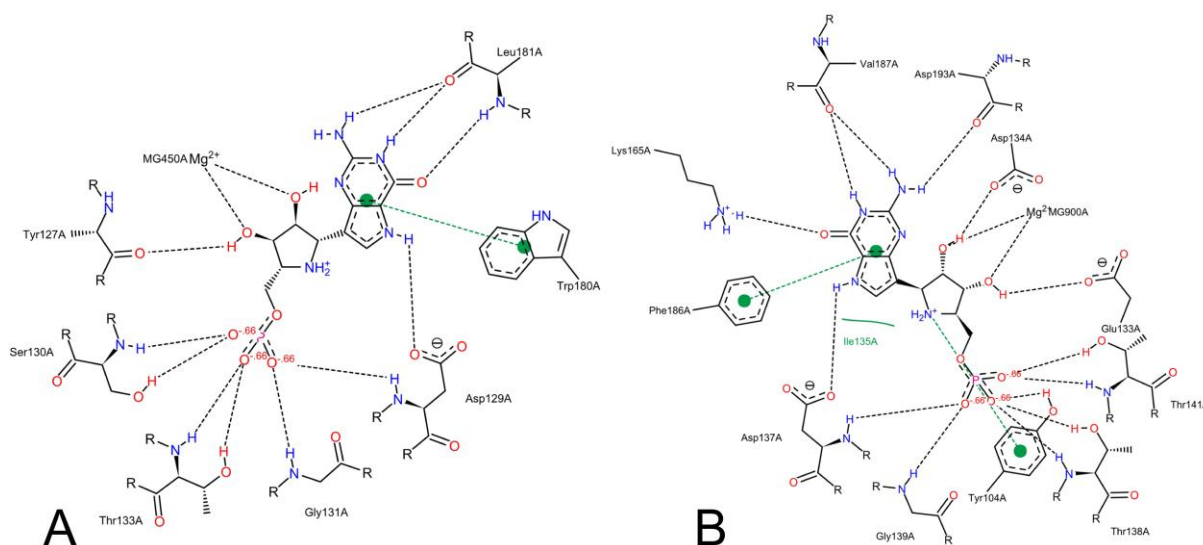


Figura 5. Comparação das interações realizadas entre o inibidor do estado de transição, fosfato de imucilina G, e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da GPRTase de *G. lamblia* (A) e HGPRTase humana (B). Diagramas de interações gerados utilizando Poseview (STIERAND; MAAß; RAREY, 2006), nos quais as linhas tracejadas pretas correspondem às ligações hidrogênio, linhas tracejadas verdes às interações π - π e a linha verde sólida a uma interação hidrofóbica.

Apesar da alta semelhança entre os dois sítios, destaca-se a interação da Lys¹⁶⁵ da HGPRTase com o oxigênio carbonílico do fosfato de imucilina G. Embora exista um resíduo correspondente na GPRTase, a Lys¹⁵², a qual interage com o oxigênio carbonílico do ligante, isso ocorre de forma indireta, utilizando duas moléculas de água como pontes (**Figura 6**). Esta interação indireta, mais fraca, confere seletividade na GPRTase por guanina já que a ausência de ligações de H entre a Leu¹⁸¹ e o nitrogênio de anilina na hipoxantina, inosina ou xantina, resulta num perfil de interações com núcleo purínico insuficiente para que estas bases atuem como substratos da GPRTase (MUNAGALA; SARVER; WANG, 2000).

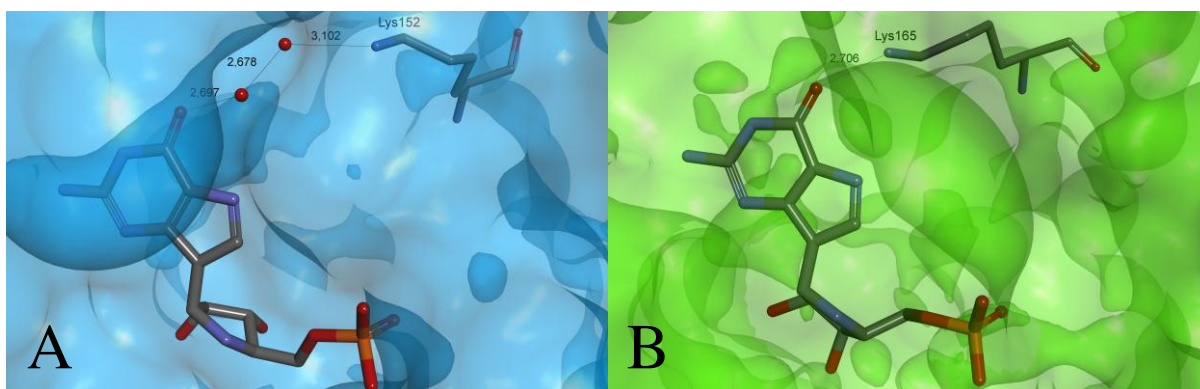


Figura 6. Comparação entre os modos de ligação do inibidor do estado de transição, fosfato de imucilina G, no sítio ativo da GPRTase de *G. lamblia* (A) e HGPRTase humana (B), destacando a interação do oxigênio carbonílico do ligante com um resíduo de lisina (medidas de distância dadas em Å). Assume-se a ocorrência de uma ligação de hidrogênio quando a distância entre os heteroátomos envolvidos na ligação é igual ou menor que 3,3 Å (RAJAGOPAL; VISHVESHWARA, 2005).

Anteriormente, nosso grupo propôs a utilização de técnicas *in silico* para a identificação de novos inibidores da GPRTase de *G. lamblia* com potencial uso terapêutico. Utilizando a molécula de água que realiza uma ligação de hidrogênio diretamente com a Lys¹⁵² como grupo farmacofórico que poderia conferir seletividade à enzima (**Figura 6**), os 1.230 compostos selecionados por triagem virtual foram posteriormente analisados por simulações de docagem molecular para se identificar os candidatos promissores. Infelizmente, nenhum destes compostos mostrou potencial de interação com a Lys¹⁵² sendo, provavelmente, inibidores não seletivos da GPRTase (DAS NEVES et al., 2017).

Neste trabalho, hipotetizou-se que a adição de uma cadeia alquílica a partir do oxigênio carbonílico do fosfato de imucilina G poderia posicionar um grupo aceptor de ligação de hidrogênio para interação direta com a Lys¹⁵² da GPRTase (**Figuras 6 e 7**). Dessa forma, este pequeno canal gerado pela “retração” do resíduo de lisina na GPRTase em relação à HGPRTase poderia conferir seletividade na interação de novos inibidores com a enzima do

parasita já que, a ausência deste na HGPRTase, forçaria o ligante a adotar um modo de ligação diferente em função da repulsão estérica. Ao mesmo tempo, propõe-se a substituição do fosfato de iminoaçúcar de **5** por um derivado de ácido *p*-toluenossulfônico que lhe seria, em tese, bioisostericamente equivalente. Bioisósteros são subestruturas que podem ser usadas para substituir outras sem que haja perda da atividade biológica de interesse. Tal substituição permitiria simplificar a estrutura original do inibidor do ponto de vista sintético, favorecendo assim a preparação em larga escala destes compostos (PATRICK; SPENCER, 2009).

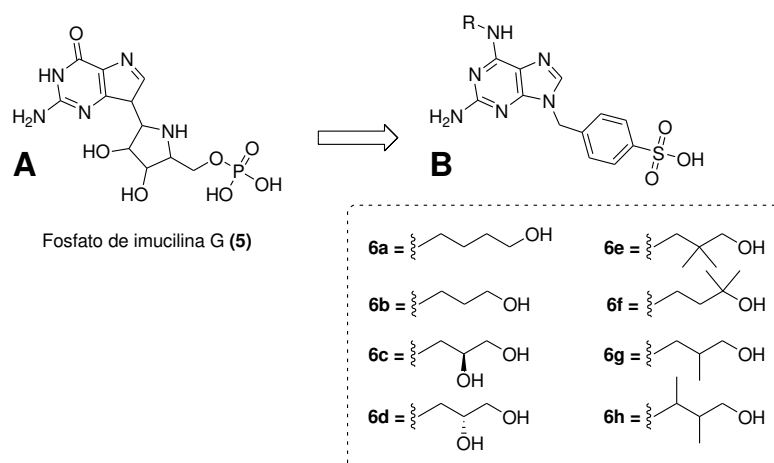


Figura 7. Planejamento de uma série de potenciais inibidores seletivos da GPRTase de *G. lamblia* (**B**) a partir da estrutura do inibidor, não seletivo, fosfato de imucilina G (**A**).

Do ponto de vista sintético, duas outras alterações foram adotadas em relação ao fosfato de imucilina G (**Figura 7**). A primeira foi a substituição do oxigênio carbonílico por um nitrogênio, de modo que se pudesse explorar uma biblioteca de aminoálcoois disponível comercialmente. A outra modificação envolveu a manutenção de todos os nitrogênios presentes no núcleo purínico da guanina, já que um destes nitrogênios foi substituído por um átomo de carbono no planejamento e subsequente síntese do fosfato de imucilina G.

Para colocar à prova a hipótese da seletividade destes compostos, foram realizadas simulações de *docking* molecular envolvendo a estrutura 3-D dos ligantes e da enzima GPRTase de *G. lamblia*. A abordagem de *docking* molecular pode ser usada para modelar a interação entre uma molécula pequena (ligante) e uma proteína em nível atômico, o que permite caracterizar o comportamento de pequenas moléculas no sítio de ligação de proteínas-alvo, visando elucidar seus processos bioquímicos fundamentais (MENG et al., 2011).

As poses de *docking* resultantes (**Figura 8, A-H**) foram comparadas ao modo de ligação do inibidor de referência **6** (**Figura 6A**). Neste sentido, os derivados **6a-d** mostraram modos de ligação com posições, orientações e conformações coerentes com o estabelecimento

de ligações de hidrogênio diretas com a Lis¹⁵² da GPRTase. Já para os compostos **6e-h**, não foi possível observar modos de ligação em que os grupos adicionados explorassem o bolso seletivo da enzima, provavelmente por conta do maior volume (repulsão estérica) provido por estes substituintes. Tal análise pode ser feita através da comparação de **6c/d** com **6g**, onde o raio atômico de van der Waals aumenta de 1,5 Å na hidroxila para 2,0 Å na metila (DECLERCQ, 1988; BATSANOV, 1995). Conforme teorizado, tais substituintes impedem que os compostos mantenham o mesmo modo de ligação frente a HGPRTase (**Figura 9, A-H**).

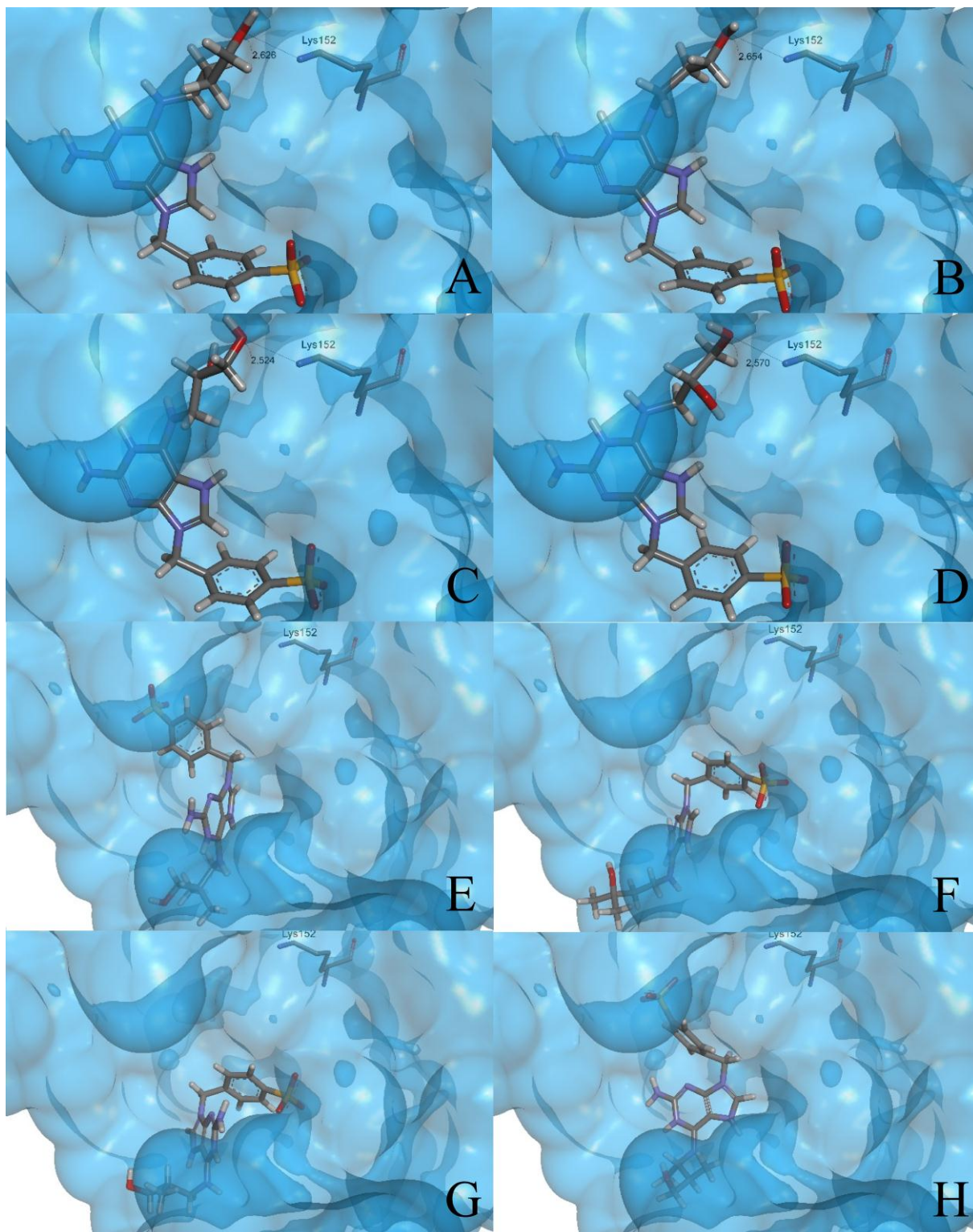


Figura 8. Modos de ligação preditos para os compostos **6a-h** no sítio ativo da GPRTase de *G. lamblia*. **A)** Modo de ligação de **6a** (escore = 149); **B)** Modo de ligação **6b** (escore = 160); **C)** Modo de ligação **6c** (escore = 156); **D)** Modo de ligação **6d** (escore = 152); **E)** Modo de ligação **6e** (escore = 127); **F)** Modo de ligação **6f** (escore = 149); **G)** Modo de ligação **6g** (escore = 138); **H)** Modo de ligação **6h** (escore = 127). Valores de escore são adimensionais e se referem às pontuações calculadas pela função de escore de docagem GoldScore, a qual considera energias de ligações de hidrogênio, energias de van der Waals, interações com metais e tensões de torcionais do ligante (VERDONK et al., 2003). Valor de comparação para escore de docagem = 205, correspondente ao *redocking* do ligante cristalográfico fosfato de imucilina G, o qual apresentou desvio quadrático médio de átomos pesados de 0,43 Å.

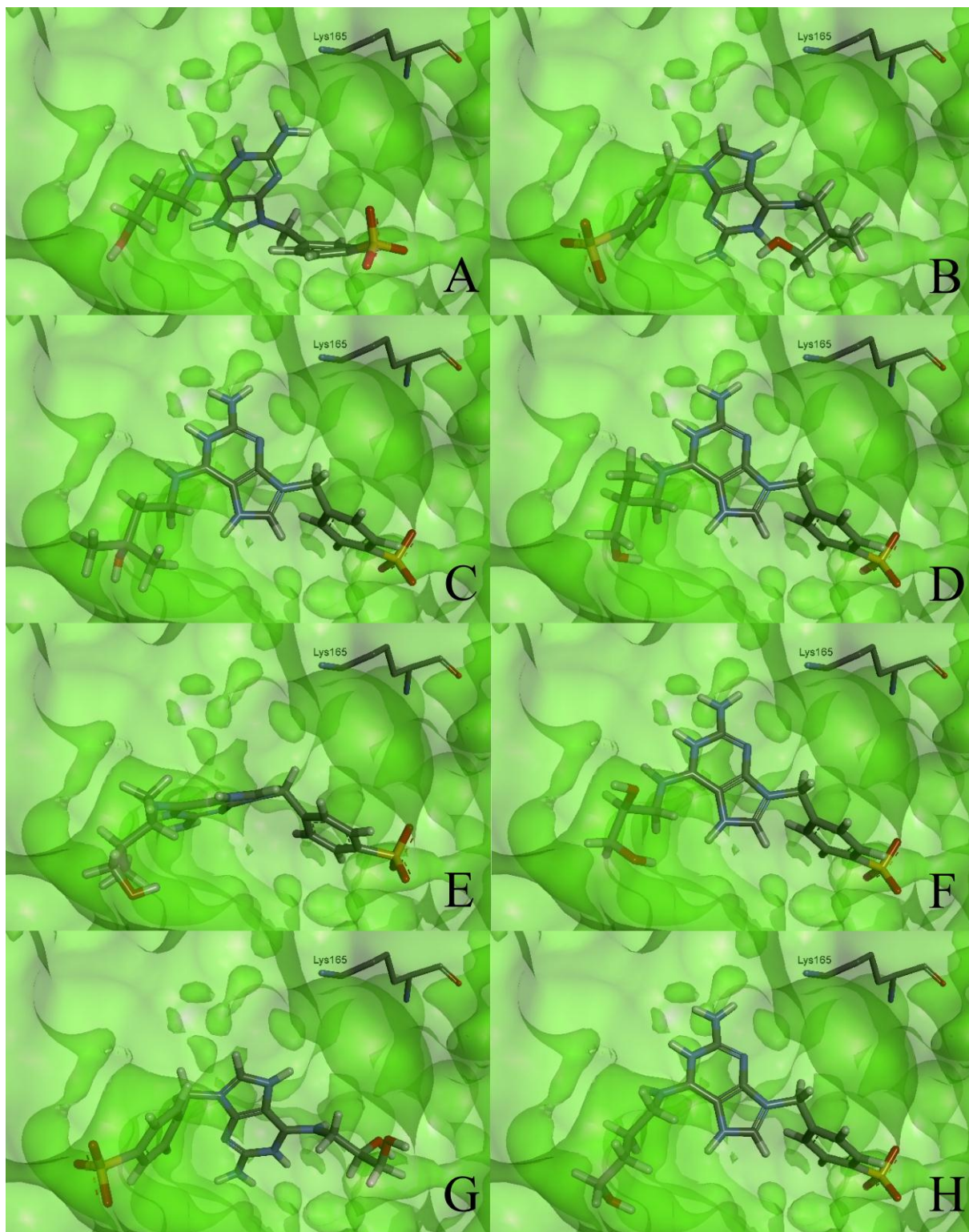


Figura 9. Modos de ligação preditos para os compostos **6a-h** no sítio ativo da HGPRTase. **A)** Modo de ligação de **6a** (escore = 89); **B)** Modo de ligação **6b** (escore = 67); **C)** Modo de ligação **6c** (escore = 93); **D)** Modo de ligação **6d** (escore = 97); **E)** Modo de ligação **6e** (escore = 82); **F)** Modo de ligação **6f** (escore = 99); **G)** Modo de ligação **6g** (escore = 79); **H)** Modo de ligação **6h** (escore = 97). Valores de escore são adimensionais e se referem às pontuações calculadas pela função de escore de docagem GoldScore, a qual considera energias de ligações de hidrogênio, energias de van der Waals, interações com metais e tensões de torcionais do ligante (VERDONK et al., 2003). Valor de comparação para escore de docagem = 97, correspondente ao *redocking* do ligante cristalográfico fosfato de imucilina G, o qual apresentou desvio quadrático médio de átomos pesados de 0,45 Å.

Ao se observar o modo geral de ligação predito para os compostos **6a-d** no sítio catalítico da GPRTase (**Figura 10, A**), percebe-se um perfil de interações intermoleculares semelhante ao descrito para o fosfato de imucilina G (**5**). Para o núcleo purínico do composto planejado **6a**, observam-se ligações de hidrogênio com a Leu¹⁸¹ e interações do tipo π - π com a Trp¹⁸⁰. Já a ligação de *H* com Asp¹²⁹, realizada com o núcleo purínico de **5** (**Figura 10, B**), em **6a** envolve um dos oxigênios do fosfato, assim como também ocorre com Ser¹³⁰ e Thr¹³³, ligações semelhantes às observadas para **5**. Tal perfil de interações é coerente com um escore de docagem mais baixo observado para **6a** (149) quando comparado ao ligante de referência **5** (205), fato previsível em decorrência da simplificação estrutural (PATRICK; SPENCER, 2009). Destaca-se ainda que o canal hidrofóbico que dá acesso ao resíduo de Lis¹⁵², específico na GPRTase em relação à HGPRTase, é formado pelos aminoácidos Ser¹⁷⁹ e Trp¹⁸⁰.

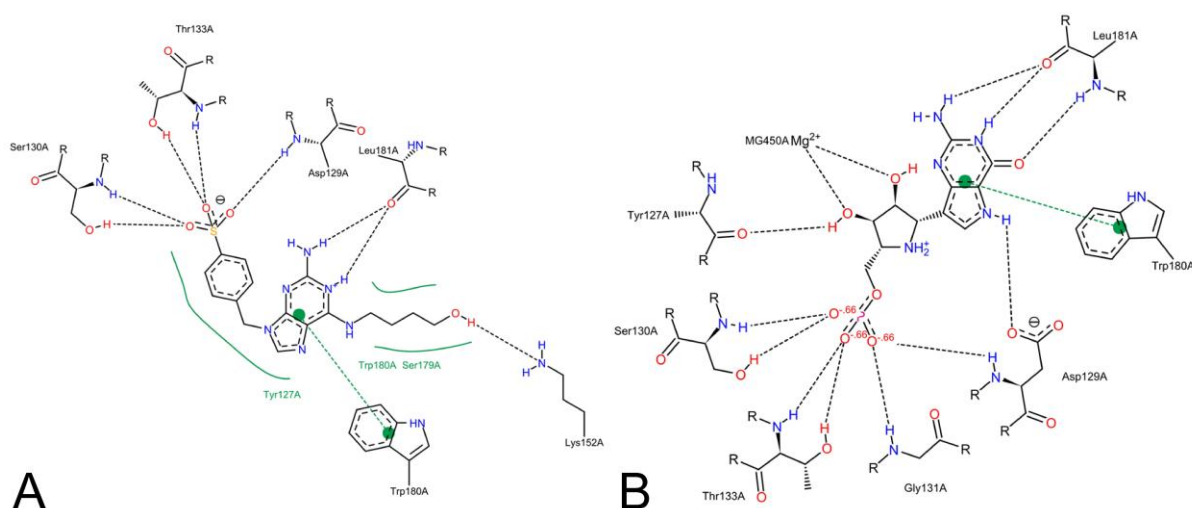


Figura 10. Comparação das interações realizadas entre os aminoácidos do sítio ativo da GPRTase de *G. lamblia* com o análogo proposto **6a** (A) e o inibidor do estado de transição, fosfato de imucilina G (B). Diagramas de interações gerados utilizando *Poseview* (STIERAND; MAAß; RAREY, 2006), nos quais as linhas tracejadas pretas correspondem às ligações de hidrogênio, as linhas tracejadas verdes às interações π - π e as linhas verde sólidas às interações hidrofóbicas.

Adicionalmente, foram realizadas predições de descritores relacionados ao perfil farmacocinético dos compostos **6a-d** (**Tabela 1**), visando elucidar se estes seriam superiores ao fosfato de imucilina G quando veiculados por via oral. Neste sentido, um destes descritores se refere ao coeficiente de partição em pH fisiológico ($\text{LogD}_{7.5}$), o qual expressa um balanço entre a lipossolubilidade (que está diretamente relacionada à solubilidade dos compostos nas membranas celulares e, consequentemente, ao processo de permeabilidade por difusão passiva) e a hidrossolubilidade, a qual impacta significativamente na dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica e, consequentemente, na biodisponibilidade (KERNS; DI, 2008).

Tabela 1. Predições dos principais descritores farmacocinéticos para os compostos **5** e **6a-d**.

Composto	Coefficiente de partição (LogD _{7.5}) ^a	Hidrosolubilidade (– log [Soly]) ^b	Volume de distribuição (L)	Ligação às proteínas plasmáticas (%)	Estabilidade metabólica CYP450 _{3A4} ^c (%)	Permeabilidade em células Caco-2 ^d
5	–7,80	–0,31	–0,52	0	100	–2,91
6a	–7,12	–0,94	0,25	22	100	–1,79
6b	–7,61	–0,47	0,25	20	100	–1,72
6c	–8,73	–0,20	0,22	8	100	–2,23
6d	–8,73	–0,36	0,10	0	100	–2,52

^aLogD_{7.5} = Log{[soluto]_{octanol} / ([soluto]_{ionizado}_{água} + [soluto]_{não_ionizado}_{água}) em pH 7,5; ^bSoly = solubilidade em água a 25 °C expressa em mol/L. ^cCYP450_{3A4} = Citocromo P450 isoforma 3A4; ^dCaco-2 = Células de adenocarcinoma de cólon humano; permeabilidades expressas em cm/s.

Neste contexto, observa-se como ideais os valores de $1 < \text{LogD}_{7.5} < 3$, já que abaixo desta faixa, a despeito da boa hidrossolubilidade, haverá baixa permeabilidade e, acima desta, a alta lipofilicidade resultará em extensiva metabolização hepática e volumes de distribuição elevados por conta da tendência dos compostos se particionarem para os tecidos (KERNS; DI, 2008). Assim, todos os compostos apresentariam baixos níveis de absorção ao serem veiculados por via oral e mesmo os ensaios de citotoxicidade no parasita e em células de mamíferos poderiam ser afetados em função da baixa permeabilidade passiva. Contudo, tanto *G. lamblia* quanto certas linhagens de células humanas dispõe de mecanismos ativos de captação de purinas (BAUM ET AL., 1993; SCHANER ET AL., 1997), sendo possível que, dada à similaridade estrutural com a guanina, **6a-d** sejam ativamente captados.

Tanto o fosfato de imucilina G quanto os compostos **6a-d** se enquadram na faixa de solubilidade moderada, expressa por $-4 \leq -\log [\text{Soly}] < -1$, que é coerente com a presença um de centro de ionização (fosfato) e de grupos capazes de estabelecer ligações de hidrogênio com as moléculas de água. Ao mesmo tempo, por conta da baixa lipofilicidade relativa, estes também apresentariam reduzida capacidade de difusão passiva através das membranas celulares, fato que refletiria em baixos volumes de distribuição tecidual ($\text{VD} < 3\text{L}$) e em índices negativos (baixos) de permeabilidade em células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2), as quais representam um modelo *in vitro* para estimativa da absorção em células epiteliais intestinais *in vivo* (CRUCIANI et al., 2000; KERNS; DI, 2008).

No cenário específico de fármacos para o tratamento de giardíase, tais perfis de permeabilidade são desejáveis pois se objetiva que o fármaco permaneça restrito ao ambiente

do parasita, sendo minimamente absorvido e distribuído para os demais tecidos de modo a reduzir a probabilidade de toxicidade nas células do hospedeiro e a ocorrência de eventos adversos decorrentes de interações inespecíficas com outros alvos. Uma vez absorvidos e chegando à corrente sanguínea, estes compostos permaneceriam pouco ligados às proteínas plasmáticas (em geral de natureza lipofílica), sendo diretamente excretados por via renal por conta da boa hidrossolubilidade. Ao mesmo tempo, a elevada estabilidade frente às enzimas do Citocromo (CYP) P450 3A4, a isoforma de maior importância para o metabolismo de fármacos, refletiria numa menor probabilidade de interações medicamentosas (CRUCIANI et al., 2000; KERNS; DI, 2008), aspectos estes que, em geral, podem ser considerados como positivos no processo do desenvolvimento de um fármaco contra *G. lamblia*.

4.2. Síntese de potenciais inibidores seletivos da GPRTase de *Giardia lamblia*

Com o intuito de se padronizar o processo de síntese para a obtenção dos análogos do fosfato de imucilina G, compostos **6a-d**, a síntese foi idealizada partindo do reagente comercial cloreto de 4-(bromometil)benzenosulfonila (**7**), o qual seria convertido no ácido 4-(bromometil)benzenosulfônico (**8**) por aquecimento a 40 °C em uma solução aquosa de HCl a 10% e dioxano (KULAGOWSKI; EDWARDS, 2009) (**Figura 11**). A partir de então, **8** seria empregado na alquilação do nitrogênio 9 (N_9) do reagente comercial 2-Amino-6-cloropurina (**9**) utilizando carbonato de potássio em dimetilformamida (DMF) em temperatura ambiente, com base na modificação de um método já descrito (BLIMAN et al., 2009). Finalmente, o núcleo de guanina presente no intermediário reacional **10** teria sua posição 6 (C_6) funcionalizada com uma série de aminoálcoois empregando-se *N,N*-Diisopropiletilamina em 2-propanol (HIROKAWA et al. 2008; LIU et al. 2016) de forma a se obter os análogos **6a-d**.

Uma questão que surge ao se analisar a (última) etapa de *N*-alquilação do núcleo purínico seria porque esta funcionalização ocorreria em N_9 , como desejado, se o núcleo possui vários nitrogênios capazes de, em tese, realizar o ataque nucleofílico ao carbono deficiente em elétrons no ácido 4-(bromometil)benzenosulfônico. Considerando o conceito de Lewis, em que as bases são vistas como entidades doadoras de pares de elétrons, é possível traçar um paralelo entre basicidade e nucleofilicidade, já que uma menor disponibilidade do par de elétrons de um nitrogênio para atacar um próton, *grosso modo*, também refletiria numa menor disponibilidade para ataque a um carbono deficiente em elétrons (SMITH, 2011), permitindo assim que se discuta as diferenças na nucleofilicidade dos nitrogênios do núcleo purínico com base nos seus valores de basicidade (pK_a).

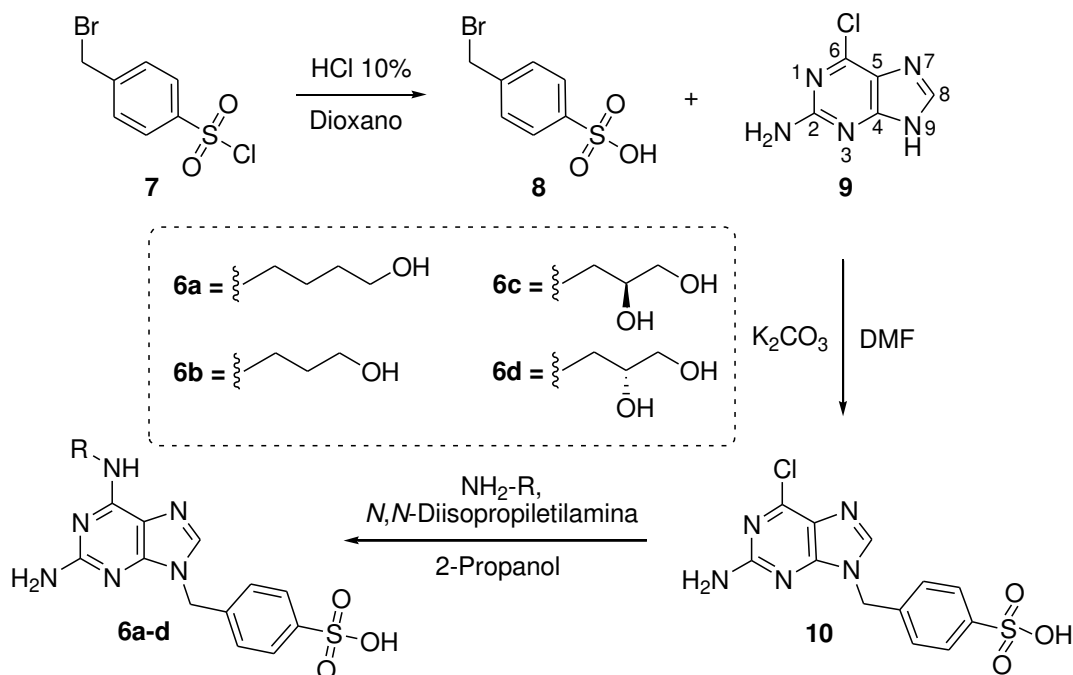


Figura 11. Rota sintética para a produção de análogos do fosfato de imucilina G.

Se a nucleofilicidade de um nitrogênio depende da disponibilidade de seu par de elétrons de realizar o ataque no carbono deficiente em elétrons, a deslocalização destes elétrons via ressonância reduzirá significativamente a nucleofilicidade deste centro. Neste sentido, N_1 e N_3 são nitrogênios estruturalmente relacionados à piridina, cujo pK_a se encontra na ordem de 5, enquanto os nitrogênios ligados a C_2 e C_6 mostrariam semelhanças com anilinas que, por conta da deslocalização de seus pares de elétrons no anel aromático (**Figura 12, A e B**), apresentam pK_a na ordem de 4,5 (DEWICK, 2013).

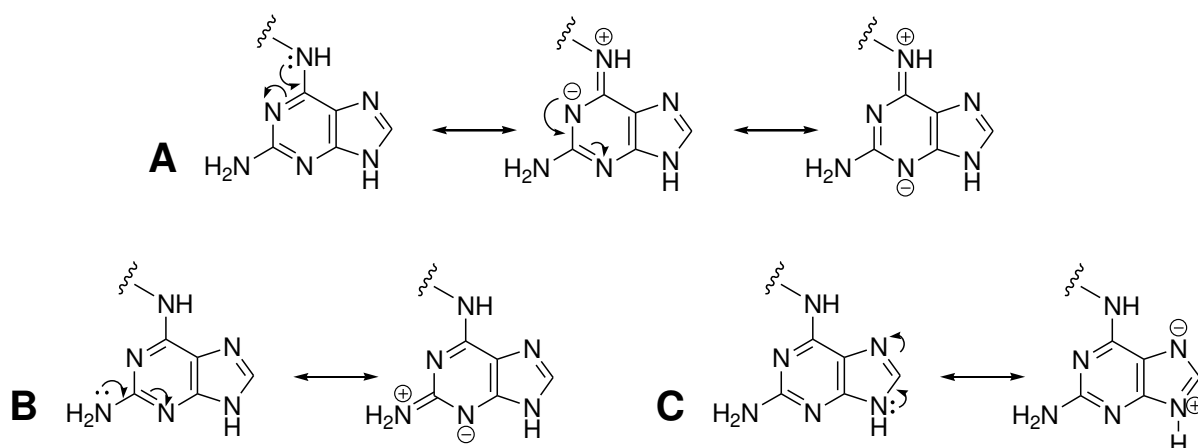


Figura 12. Estruturas canônicas de ressonância envolvendo os nitrogênios ligados a C_6 (**A**) e C_2 (**B**), e do N_9 (**C**) do núcleo purínico.

Com relação aos nitrogênios imidazólicos, N₇ tenderia a apresentar basicidade semelhante à descrita para as iminas, cujo pK_a observado é da ordem de 4. As iminas são intrinsicamente menos básicas que as aminas correspondentes porque a hibridização sp² da ligação C=N resulta em menores comprimentos de ligação, o que em última análise resulta numa menor disponibilidade do par de elétrons livre do nitrogênio. Contudo, neste caso específico, a nucleofilicidade sobre N₇ seria um pouco maior do que a observada para uma imina simples por conta da contribuição da estrutura canônica de ressonância na qual a carga negativa se concentra sobre este átomo (**Figura 12, C**) (DEWICK, 2013).

Assim, o N₉ apresentaria a maior nucleofilicidade dentre todos os nitrogênios por ser uma amina secundária, na qual o efeito indutivo doador de elétrons promovido pelos carbonos vizinhos aumentaria a densidade sobre o par de elétrons livres deste nitrogênio, resultando assim em valores de pK_a na ordem de 10,5 (DEWICK, 2013). Neste contexto, reações de *N*-alquilação do núcleo purínico como as propostas neste trabalho conduzem à formação do produto reacional predominante funcionalizado em N₉ (BLIMAN et al., 2009).

Desse modo, iniciou-se a padronização da rota sintética pelas tentativas de obtenção de **5b**. A primeira etapa da rota consistiu na obtenção do ácido 4-(bromometil)benzenosulfônico (**8**) a partir do cloreto de 4-(bromometil)benzenosulfonila (**7**). Esta conversão já foi descrita tanto em solução aquosa de ácido clorídrico 10% e dioxano sob aquecimento a 40°C (KULAGOWSKI; EDWARDS, 2009) quanto em refluxo de uma mistura de etanol e água (GIRARD-LAURIAULT; BOYD, 2002). Os ácidos sulfônicos sofrem reações de substituição nucleofílica (**Figura 13**) de maneira muito similar à observada para os ácidos carboxílicos correspondentes, já que estes se diferenciam entre si apenas pelo átomo central, ou seja, pela troca de um enxofre hexavalente por um carbono tetravalente (FOX; WHITESELL, 2004).

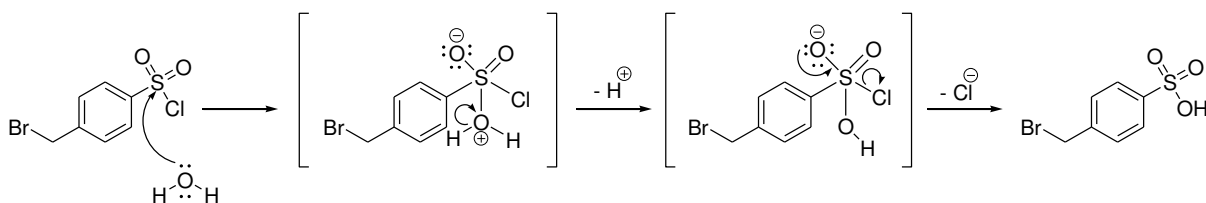


Figura 13. Mecanismo proposto para a síntese do ácido 4-(bromometil)benzenosulfônico (**8**). Adaptado de Fox & Whitesell (2004).

Assim, iniciou-se a tentativa de síntese de **8** empregando o protocolo descrito por Kulagowski e Edwards (2009), no qual o cloreto de 4-(bromometil)benzenosulfonila foi

solubilizado em dioxano e ácido clorídrico 10% (1:1, v/v) e mantido sob agitação a 40°C por 4h. Como os autores não descrevem a fase móvel utilizada para o acompanhamento da reação por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), foi realizado um estudo para se selecionar a fase móvel mais adequada (**Tabela 2**). Como o produto formado, um ácido sulfônico, é uma estrutura altamente polar e, por isso tende a interagir fortemente com os grupos silanóis da fase estacionária, os melhores resultados de separação foram obtidos com solventes polares, com destaque para o uso de etanol puro como fase móvel.

Tabela 2. Valores de fator de retenção (R_f) obtidos em corridas de cromatografia em camada delgada analítica empregando sílica gel como fase estacionária e diferentes solventes e misturas de solventes como fases móveis.

Fase móvel	Fator de retenção (R_f)* para o material de partida	Fator de retenção (R_f)* para o(s) produto(s) reacional(ais)
Tolueno	0,82	0
Tolueno + Ácido Acético (0,05%)	0,72	0
Tolueno + Acetona (1:1, v/v)	0,80	0
Acetona	0,77	0,06 / 0,26
Acetona + Ácido Acético (0,05%)	0,84	0,05 / 0,27
Etanol	0,84	0,08 / 0,40
Etanol + Ácido Acético (0,05%)	0,91	0,26
Clorofórmio/Metanol/Água (65:25:5, v/v/v)	0,89	0,05

R_f = (Distância percorrida pelo composto) / (Distância percorrida pela frente do solvente).

Percebe-se que com algumas das fases móveis, a mancha que se acreditava corresponder a um único produto da reação se desdobra em duas, sugerindo a formação de um subproduto. De acordo com o protocolo preconizado por Kulagowski e Edwards (2009), o bruto reacional deveria ser purificado por cristalização em clorofórmio para fornecer **8** em sua forma pura. Contudo, não foi possível solubilizar o produto reacional em clorofórmio, mesmo sob aquecimento, de modo que outros solventes como acetona, acetato de etila e etanol/água (9:1, v/v) foram testados, mas também sem sucesso.

Revisão da literatura pertinente indicou que a forma anidra de derivado do ácido *p*-toluenossulfônico podem ser cristalizadas a partir de tolueno, clorofórmio, acetato de etila, metanol anidro ou a partir da solubilização em acetona seguida de precipitação por adição de tolueno (ARMAREGO; CHAI, 2003). Tentou-se então remover as prováveis águas de cristalização no produto ao aquecer o sólido reacional acima do ponto de fusão (160 °C) com secagem simultânea em bomba de alto vácuo, mas a análise por CCDA indicou a degradação do produto reacional. Tentativas de síntese de **8** pelo protocolo preconizado por Girard-

Lauriault e Boyd (2002), no qual o reagente comercial **7** é mantido sob temperatura de refluxo de uma mistura de etanol e água (32:1, v/v) por 3h resultaram em um perfil idêntico nas análises por CCDA quando comparado às reações realizadas em dioxano e ácido clorídrico 10%. Como os autores também não descrevem um procedimento de purificação adequado e não foi possível purificar o produto por cromatografia em coluna clássica em função da alta polaridade do produto e dos subprodutos, optou-se por realizar a etapa subsequente sem a purificação prévia de **8**, focando assim diretamente na purificação cromatográfica de **10**.

A síntese de **10** foi inicialmente ensaiada de acordo com uma adaptação do protocolo descrito por Bliman et al. (2009), utilizando carbonato de potássio como base e *N,N*-dimetilformamida (DMF) como solvente reacional. Por ser um solvente polar aprótico (ou seja, que não possui grupo doador de ligação de hidrogênio), o DMF não reduz significativamente a disponibilidade do par de elétrons para o ataque nucleofílico, sendo extremamente útil em reações do tipo S_N2 como a em questão (REICHARDT; WELTON, 2011). Reações de *N*-alquilações de aminas de aminas secundárias procedem com a formação inicial da amina protonada (carregada), a qual sofre a abstração subsequente deste próton pela base para a formação do composto de interesse (**Figura 14**) (SMITH; MARCH, 2007).

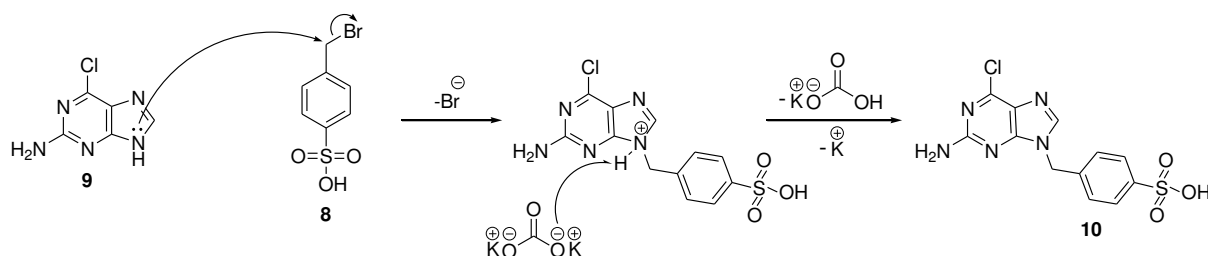


Figura 14. Mecanismo proposto para a síntese de **10**. Adaptado de Smith & March (2007).

Para evitar reações secundárias já que a água também pode atuar como nucleófilo e considerando a natureza higroscópica dos ácidos sulfônicos (MURRAY, 1977), foi realizada a secagem de (**8**) em bomba de óleo por 6 horas, do carbonato de potássio (K_2CO_3) em estufa anidra a 160 °C por 14h (sendo este posteriormente armazenado em dessecador) e a remoção dos traços água no DMF por destilação azeotrópica com tolueno, armazenando o solvente anidro em peneira molecular (ARMAREGO; CHAI, 2003). Nesta reação, empregou-se excesso (1,6 equivalentes) de **8** em relação aos demais reagentes, mantendo-se agitação constante sob temperatura ambiente e atmosfera de N_2 por 24 h (BLIMAN et al., 2009).

Contudo, análise por CCDA empregando como fase móvel etanol, água e *N,N*-Diisopropiletilamina (87:10:3, v/v/v) após 24h sugeriu que apenas uma pequena proporção de

do produto havia sido formada, sendo que a maior parte dos materiais de partida permanecia sem ser consumida. Na tentativa de aumentar a reatividade do ácido 4-(bromometil)benzenosulfônico (**8**), procedeu-se sua conversão *in situ* no ácido 4-(iodometil)benzenosulfônico (**Figura 15**), já que os iodetos de alquila são mais reativos do que os brometos de alquila correspondentes (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

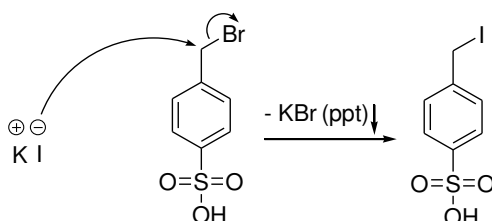


Figura 15. Conversão do ácido 4-(bromometil)benzenosulfônico em ácido 4-(iodometil)benzenosulfônico. Adaptado de Clayden, Greeves e Warren (2012).

Esta conversão pode ser realizada empregando um sal de iodo em acetona ou DMF (iodeto de potássio ou sódio, por exemplo), promovendo a chamada reação de Finkelstein, a qual envolve a transformação de um cloreto ou brometo de alquila no iodeto correspondente. Ao contrário dos sais de iodo, os cloretos/brometos de sódio ou potássio são insolúveis em acetona e DMF, de modo que estes precipitam logo após serem formados. Pelo princípio de Le Chatelier, se um dos produtos é insolúvel no solvente racional, ocorre o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do iodeto de alquila, mesmo este sendo relativamente menos estável do que o material de partida (RZEPA, 2015).

No retículo cristalino formado (**Figura 16**), cada molécula de iodeto de sódio (ou de potássio) se liga a outras três moléculas de acetona (ou dimetilformamida). Cada oxigênio carbonílico do solvente possui pares de elétrons não ligados que são utilizados para coordenar um íon de sódio (ou potássio) diferente, de modo que cada cátion está coordenado a seis pares de elétrons livres. A conformação resultante, um octaedro rígido com cavidades triangulares entre as moléculas do solvente, garante assim a solubilidade do sal de iodo (HOWIE; WARDELL, J., 2003).

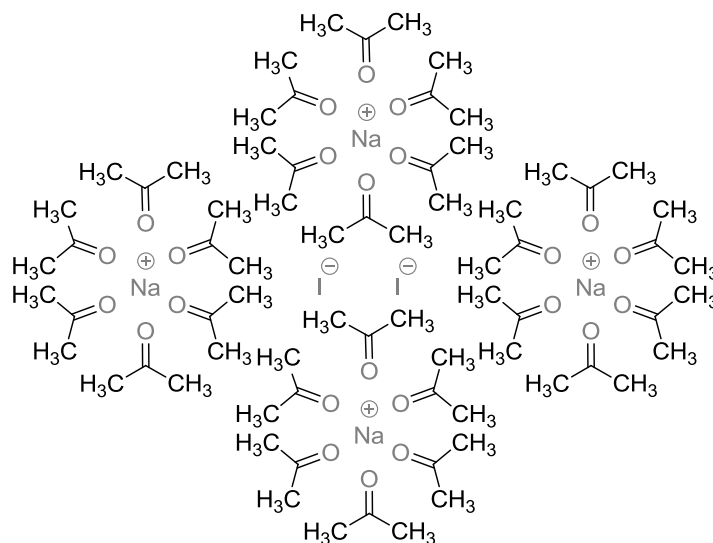


Figura 16. Reticulo cristalino (Acetona)₃NaI. Adaptado de Howie e Wardell (2003).

Neste sentido, adicionou-se uma quantidade catalítica de iodeto de potássio e a reação prosseguiu por mais 90 h sob as mesmas condições descritas anteriormente, quando o *work-up* foi realizado por filtração, para remoção do carbonato de potássio e do brometo de potássio, e pela retirada do solvente em rotaevaporador acoplado a uma bomba de alto vácuo, adicionando-se tolueno para a remoção azeotrópica do DMF e posterior remoção do tolueno em mistura azeotrópica com diclorometano. Foram realizadas tentativas de purificação do produto por recristalização em acetona, acetato de etila e clorofórmio, porém sem sucesso. Um fato interessante é que se observou a precipitação constante de sólido a partir da acetona, mas este diferia do que se acreditava ser o produto reacional ($R_f = 0,67$). Já que a quantidade de **10** diminuía proporcionalmente à formação do precipitado, acreditava-se se tratar de um produto da sua degradação, no momento de natureza desconhecida (ver discussão adiante). Como não possível obter **10** na forma pura, uma nova rota sintética foi proposta (**Figura 17**).

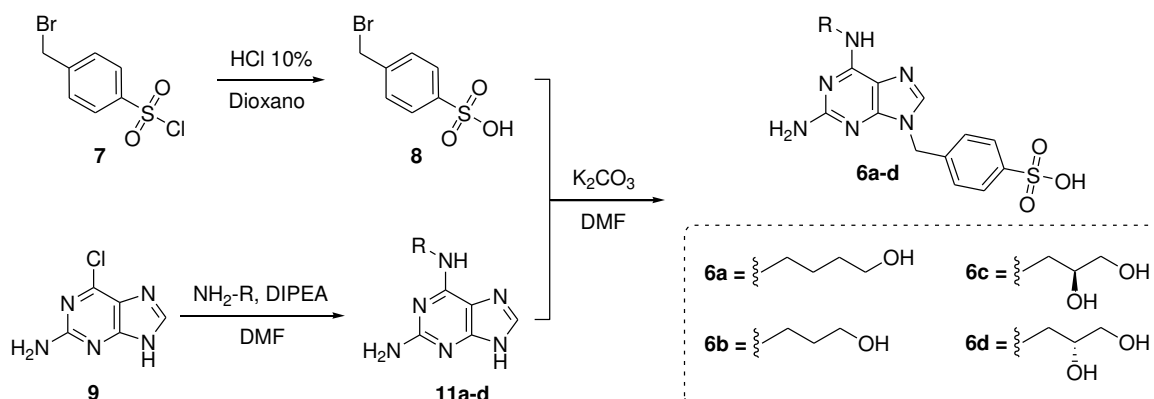


Figura 17. Rota sintética alternativa para a produção de análogos do fosfato de imucilina G.

Desse modo, procedeu-se a substituição nucleofílica aromática do cloro em **9** pelo nitrogênio do 3-Aminopropanol, que se mostra melhor nucleófilo do que o oxigênio, o qual, por ser mais eletronegativo, apresenta uma menor disponibilidade de seus pares de elétrons de realizarem o ataque nucleofílico (DEWICK, 2013). Reações nessa etapa foram feitas a partir de 1 equivalente de **9**, 1,2 equivalentes de *N,N*-Diisopropiletilamina (DIPEA) e 5 equivalentes do aminoálcool, as quais ocorreram sob agitação em atmosfera inerte a 80 °C por 1h (BOËNS et al., 2013). Análise por CCDA empregando com fase móvel álcool amílico, ácido acético e água (4:1:1, v/v/v) sugeriram a formação do produto **11b** com um valor de R_f intermediário (0,34) ao dos materiais de partida, purina ($R_f = 0,67$) e aminoálcool ($R_f = 0,06$). Após a remoção do solvente, o bruto reacional foi dissolvido em diclorometano e as impurezas precipitadas em temperatura ambiente *overnight* para fornecer o produto em rendimento de 41% o qual, apesar de moderado, foi suficiente para o prosseguimento da rota. A formação do produto foi confirmada por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) (Figura 18).

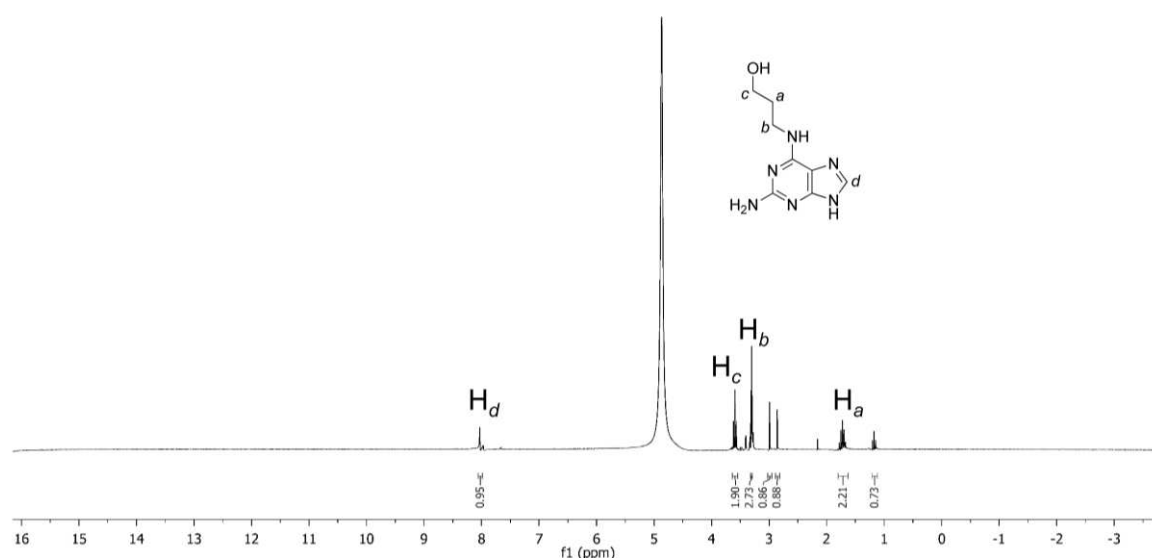


Figura 18. Espectro de RMN ^1H de 3-[(2-amino-9*H*-purin-6-il)amino]propan-1-ol (**11b**) (250 MHz, CH_3OD).

Procedeu-se então a condensação de **11b** e **8** nas mesmas condições descritas para as tentativas de síntese de **10** (BLIMAN et al., 2009). Contudo, como **8** se encontrava parcialmente impuro, como anteriormente relatado, empregou-se excesso de 1,6 equivalentes da purina **11b** em lugar de **8** para garantir que todo o ácido 4-(bromometil)benzenosulfônico fosse consumido na formação do produto desejado, possibilitando assim sua separação da impureza inicial por cromatografia em coluna clássica (CCC). Outra modificação foi que,

como a purina **11b** já não apresentava mais um grupo abandonador na posição 6, a temperatura da reação pôde ser aumentada para 65 °C sem a ocorrência de reações paralelas, diminuindo o tempo total de reação para 40 horas. Após o *work-up*, o produto foi isolado na forma pura por CCC empregando etanol como eluente em rendimento de 1,5%, e submetido à análise por RMN de ^1H . Contudo, o que se confirmou foi uma extensa mistura de compostos na análise de RMN de ^1H (**Figura 19**).

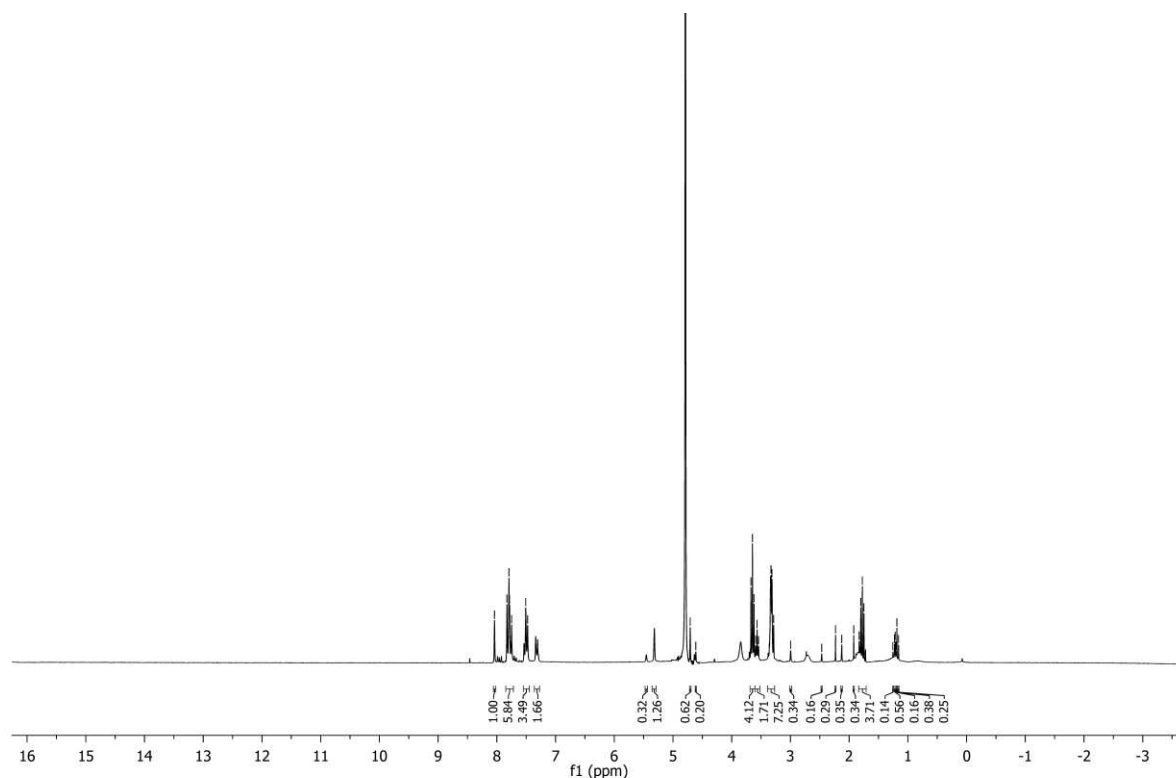


Figura 19. Espectro de RMN ^1H dos produtos reacionais na tentativa de síntese do ácido 4-({2-amino-6-[(3-hidróxiopropil)amino]-9H-purin-9-il} metil)benzeno-1-sulfônico (**6b**) (250 MHz, DMSO- d_6).

Tal fato, associado ao baixo rendimento final da reação e a observação em reações anteriores da precipitação de produtos de degradação na condensação do derivado de ácido sulfônico com a purina (síntese de **10**), sugeriram que a degradação de **6b** também poderia estar ocorrendo. Revisão da literatura revelou que pirróis, indóis e análogos sofrem polimerização catalisada por ácidos fortes, formando principalmente dímeros e trímeros (SMITH, 1963). Com base na semelhança do anel imidazólico de **6b** com o anel pirrólico (substituição de N_7 por um átomo de carbono) o mecanismo de dimerização de **6b** foi proposto (**Figura 20**).

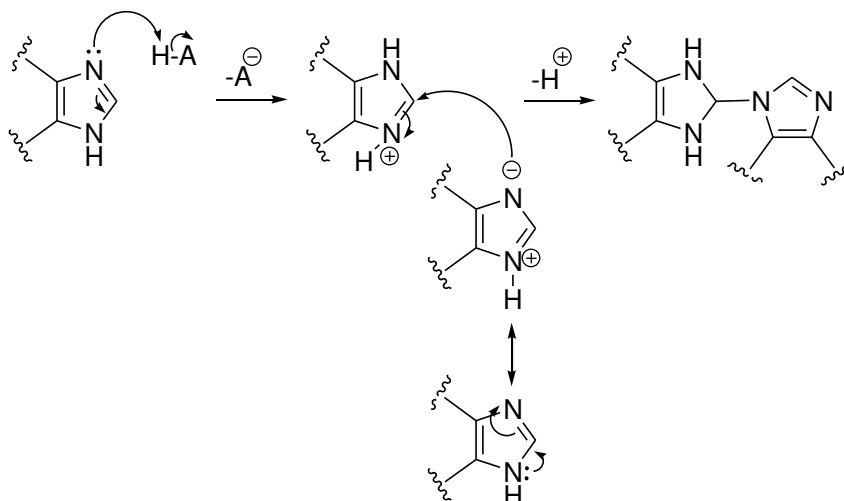


Figura 20. Mecanismo da dimerização de **6b** catalisada por ácido (HA). Adaptado de Smith (1963).

De fato, Yee et al. (1990) descrevem que na tentativa de condensação de um indol com o ácido 4-(bromometil)benzenosulfônico (**8**) o produto final sofreu rápida decomposição após ser isolado, sendo apenas possível isolar este composto após a conversão do ácido sulfônico no sal sódico, de modo a excluir completamente os prótons do meio. Desse modo, a rota sintética foi novamente revisada visando a obtenção do sal sódico do ácido 4-(bromometil)benzenosulfônico (**Figura 21**), sendo a síntese do sal (**8s**) alcançada através de aquecimento de **7** em temperatura de refluxo de mistura de etanol e água (97:3, v/v) por 3h, seguido da remoção do solvente e ressuspensão do bruto reacional em água contendo NaOH (1 equivalente) (GIRARD-LAURIAULT; BOYD, 2002). Após a remoção do solvente, a análise do sólido por CCDA revelou um perfil de impurezas semelhante ao observado para a síntese de **8** quando realizada em dioxano e ácido clorídrico 10% (1:1, v/v) (KULAGOWSKI; EDWARDS, 2009).

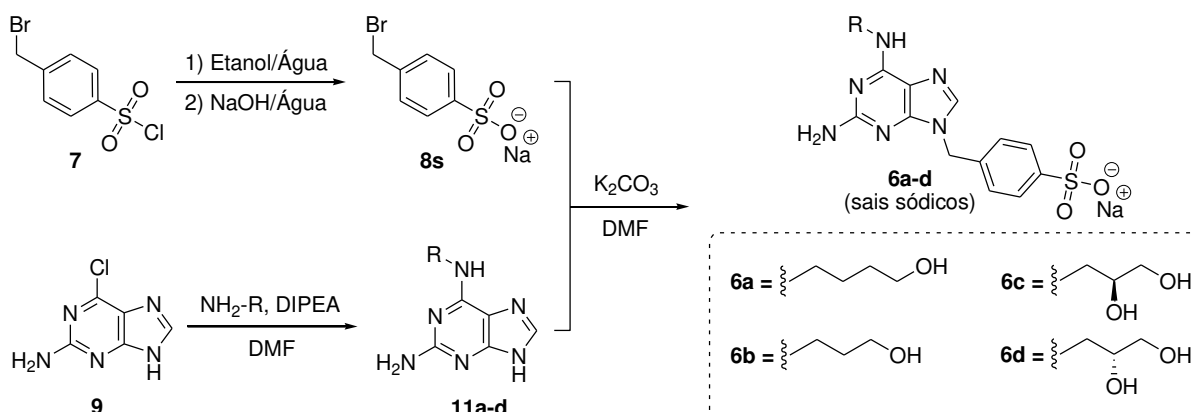


Figura 21. Rota sintética revisada para a produção de análogos do fosfato de imucilina G.

A solução aquosa de **8s** foi então submetida à liofilização, processo que permite que a água, depois de congelada, seja removida sob vácuo diretamente através de sublimação, sem ter que passar por uma fase líquida intermediária. Por conta dessas características, quando realizada de forma adequada, a liofilização possibilita que produtos intrinsecamente instáveis possam ter uma vida útil mais longa, mesmo se armazenadas à temperatura ambiente, já que estes seriam colocados em um estado de atividade suspensa (GREIFF, 1992).

Neste caso em específico, se garantiria que a totalidade do composto **8s** permanecesse na forma de sal sódico, reduzindo assim a possibilidade de ocorrência de degradação nas reações subsequentes. Procedeu-se então a condensação de **11b** e **8s** nas mesmas condições descritas para as tentativas de síntese de **10** (BLIMAN et al., 2009). Desta vez, análise por CCDA (álcool amílico, ácido acético e água, 4:1:1, v/v/v) indicou a formação majoritária de um único produto ($R_f = 0,02$), embora o consumo da purina tenha sido parcial. Considerando a natureza básica do núcleo purínico, a fase estacionária escolhida para a purificação do produto reacional por CCC foi a alumina (óxido de alumínio; fase móvel diclorometano e metanol 7:3, v/v) que, por possuir uma superfície mais básica do que a sílica se mostra adequada para a separação de compostos básicos (TROY, 2005). Contudo, a purificação foi parcial já se observou por CCDA a co-eluição de contaminante em todas as frações, conforme também se pode observar via RMN de ^1H (**Figura 22**).

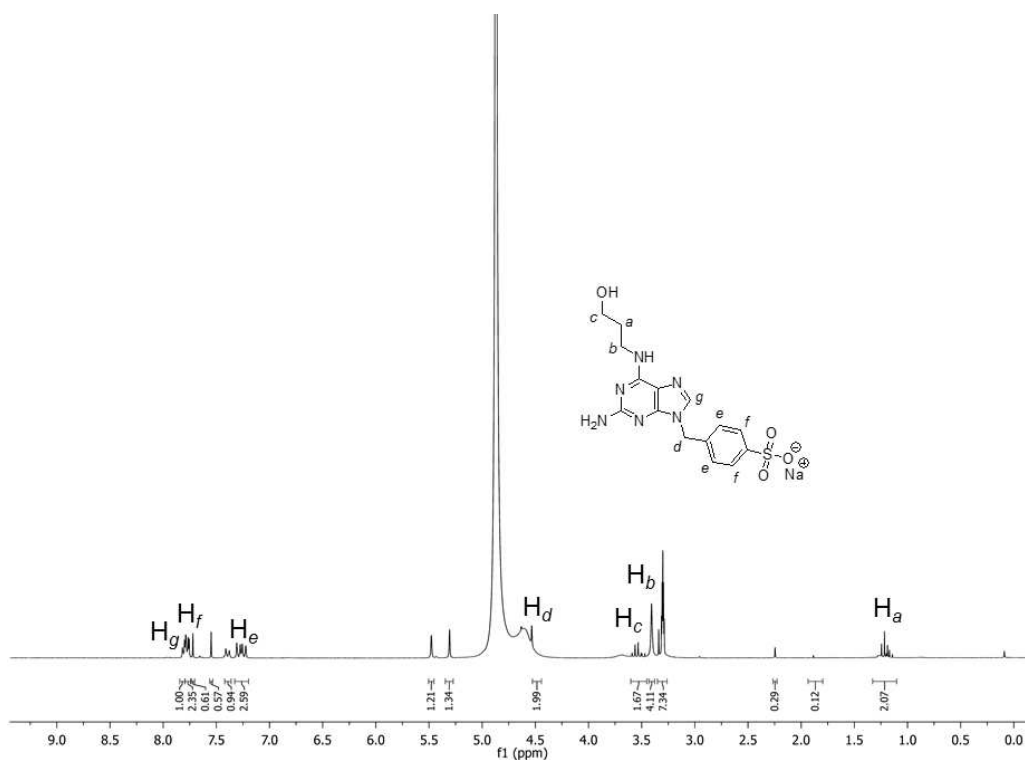


Figura 22. Espectro de RMN ^1H do sal sódico do ácido 4-({2-amino-6-[(3-hidróxiopropil)amino]-9H-purin-9-il} metil)benzeno-1-sulfônico (**6b**) (250 MHz, CH_3OD).

Ressalta-se que, segundo Bliman et al. (2009), a conjugação de derivados benzílicos no N₉ da purina promove uma alteração no deslocamento químico do sinal referente ao N=CH vizinho, originalmente na ordem de 8 ppm (**Figura 18**) para a casa de 7,75 ppm (**Figura 22**), fato que também pôde ser observado para **6b**, ainda que na forma parcialmente pura. Posteriormente, foi possível alcançar a purificação de **6b** por recristalização em éter etílico (**Figura 23**), deixando tais contaminantes solúveis na fase etérea. Apesar da pequena massa resultante, 1,4 mg, a amostra foi enviada para análise de RMN de ¹H, da qual aguardamos o resultado no presente momento.

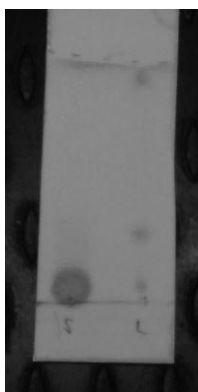


Figura 23. Análise por cromatografia em camada delgada analítica após recristalização do sal sódico do ácido 4-({2-amino-6-[(3-hidróxipropil)amino]-9H-purin-9-il}metil)benzeno-1-sulfônico (**6b**). *S* = fase sólida (recristalizado) e *L* = fase líquida. Fase móvel: álcool amílico, ácido acético e água, 4:1:1, v/v/v.

Uma vez que a síntese de **6b** foi padronizada e, que, provavelmente, esta possa ser integralmente aplicada a **6a** sem modificações por conta da alta similaridade estrutural entre os dois compostos, os esforços foram se voltaram para a padronização da síntese de **6d**. Neste sentido, iniciou-se pela tentativa de síntese de **11d** empregando o mesmo protocolo previamente usado para a síntese de **11b**. Contudo, ao contrário de **11b**, o produto não pôde ser separado do excesso de aminoálcool por solubilização com diclorometano. Foram então testados diferentes solventes, sendo os melhores resultados alcançados por extrações com éter etílico e acetonitrila (**Figura 24**).

O extraído com acetonitrila foi enviado para análise por RMN de ¹H (**Figura 25**) e, embora seja possível perceber a presença de alguns contaminantes, os sinais referentes ao aminoálcool puderam ser observados, confirmando assim a formação de **11d**. Infelizmente, não houve de se ensaiar a condensação de **11d** com **8s** e, portanto, não foi possível confirmar se seria possível obter **6d** na forma pura após a recristalização do produto reacional a partir de éter etílico.

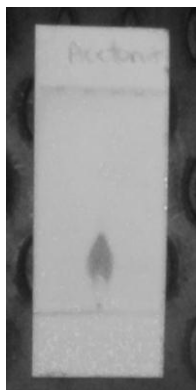


Figura 24. Análise por cromatografia em camada delgada analítica após extração com acetonitrila do produto reacional da síntese do composto (2*S*)-3-[(2-amino-9*H*-purin-6-il)amino]propano-1,2-diol (**11d**). Fase móvel: álcool amílico, ácido acético e água, 4:1:1, v/v/v.

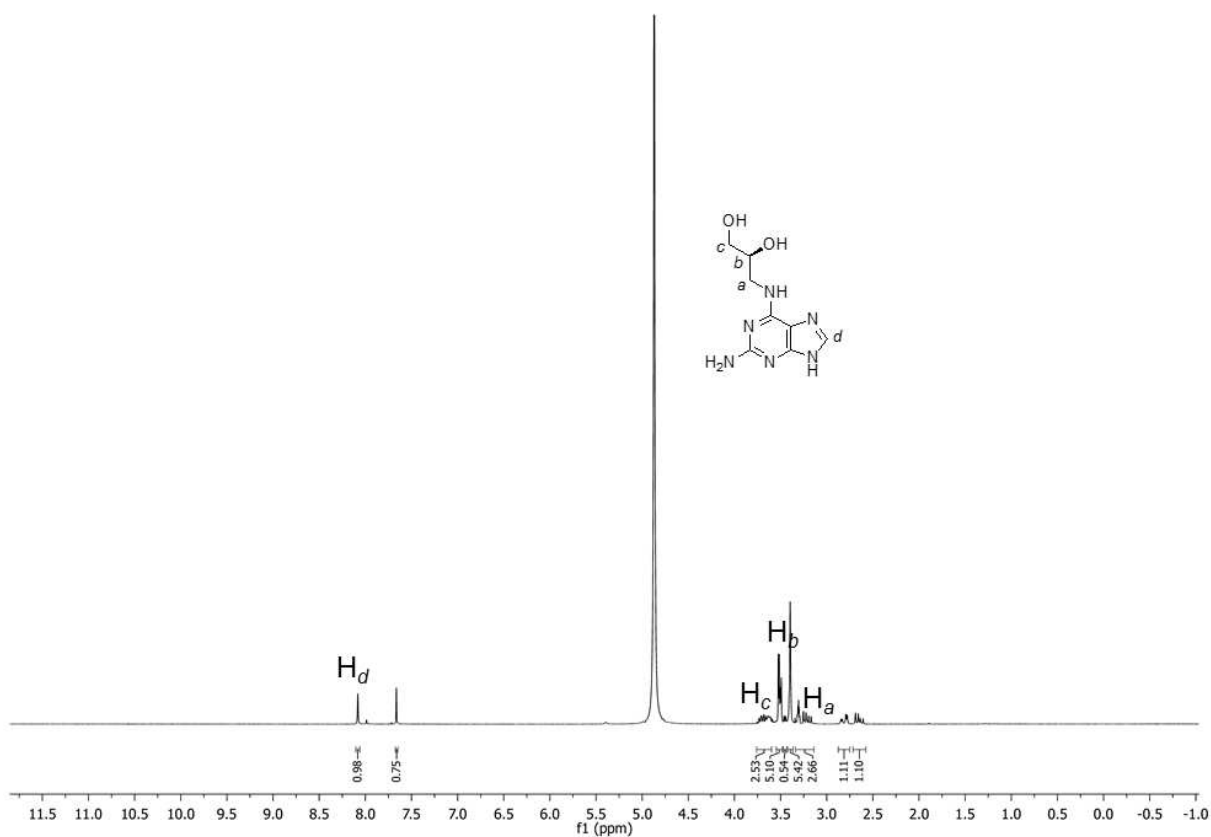


Figura 25. Espectro de RMN ¹H de (2*S*)-3-[(2-amino-9*H*-purin-6-il)amino]propano-1,2-diol (**11d**) (250 MHz, CH₃OD).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A giardíase permanece como um problema relevante de saúde pública, seja pelos quadros clínicos mais graves em pacientes imunocomprometidos, seja pela incidência crescente de cepas resistentes aos fármacos empregados para o seu tratamento. Embora a GPRTase do parasita seja um alvo terapêutico interessante, a falta de seletividade dos inibidores atuais representa um obstáculo para o emprego clínico destes compostos.

Apesar da alta similaridade observada para os resíduos envolvidos na ligação do substrato e catálise quando se realizou a comparação do sítio de ligação da enzima do parasita (GPRTase) com sua homóloga nos seres humanos (HGPRTase), aventou-se a possibilidade de explorar um pequeno canal hidrofóbico formado pelos aminoácidos Ser¹⁷⁹ e Trp¹⁸⁰, o qual se torna acessível na GPRTase pela “retração” de um resíduo de lisina (Lis¹⁵²) em relação ao aminoácido correspondente na HGPRTase. Simulações de *docking* molecular reforçaram a possibilidade de se alcançar seletividade na ligação quando se adiciona uma cadeia alquílica a partir do heteroátomo ligado ao C₆ do núcleo purínico e se mantém um grupo aceptor de ligação de hidrogênio (OH) terminal para interação direta com a Lis¹⁵².

Ao mesmo tempo, a simplificação estrutural, idealizada através da substituição bioisostérica do grupo fosfato e do iminoaçúcar no ligante de partida, fosfato de imucilina G, por um derivado de ácido *p*-toluenossulfônico nos ligantes **6a-d**, tende a facilitar a síntese destes compostos, sem que haja uma queda abrupta no perfil de inibição frente à GPRTase, conforme sugerido pelas simulações de *docking* molecular.

Ainda em relação aos métodos *in silico*, os compostos idealizados apresentaram descritores farmacocinéticos que sugerem uma baixa absorção pelo lúmen intestinal, o que seria desejável para um fármaco empregado no tratamento da giardíase por ser possível empregar uma dose menor, além de ser menos provável a manifestação de eventos adversos e interações medicamentosas. Contudo, esta baixa permeabilidade em membranas biológicas pode afetar a eficácia destes compostos sobre o parasita, se estes não forem capazes de explorar seus mecanismos ativos de captação de purinas.

Apesar da necessidade de se alterar e adaptar frequentemente a rota sintética, a síntese do primeiro análogo, **6b**, foi alcançada com sucesso. Os rendimentos reacionais para esta reação poderão ser melhorados no futuro, visto que a recristalização do produto final em éter etílico se mostrou altamente efetiva na remoção dos subprodutos reacionais, sem que haja a necessidade de prévia purificação por CCC, conforme inicialmente proposto. Ressalta-se,

ainda, que os métodos de síntese descritos para **6b**, provavelmente, poderão ser integralmente aplicados à síntese de **6a** por conta da alta similaridade estrutural entre os dois compostos. Com relação à síntese de **6c/6d**, apenas houve tempo hábil para a síntese do primeiro intermediário sintético, não sendo possível ensaiar a condensação de **11d** com **8s** e, portanto, também não sendo possível confirmar se seria possível obter **6c/6d** na forma pura após a recristalização dos produtos reacionais a partir de éter etílico.

A síntese dos compostos aqui idealizados será finalizada após o término desta dissertação de mestrado, sendo estes sintetizados, purificados e enviados para avaliação de ausência de toxicidade em linhagens de células de mamíferos e de toxicidade frente à cultura do parasita, visando assim pôr à prova a hipótese originalmente proposta, de que tais compostos poderiam inibir seletivamente a GPRTase de *G. lamblia*, sem causar uma inibição significativa da HGPRTase humana.

REFERÊNCIAS

- ADAM, R. M. Biology of *Giardia lamblia*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 447-475, 2001.
- ALDRITT, S. M.; WANG, C. C. Purification and characterization of guanine phosphoribosyltransferase from *Giardia lamblia*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 18, p. 8528-8533, 1986.
- ARMAREGO, W. L. E.; CHAI, C. L. L. **Purification of laboratory chemicals**. USA: Butterworth-Heinemann, 2003.
- ARONOV, A. M.; MUNAGALA, N. R.; KUNTZ, I. D.; WANG, C. C. Virtual screening of combinatorial libraries across a gene family: in search of inhibitors of *Giardia lamblia* guanine phosphoribosyltransferase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2571-76, 2001.
- AROOJ, M.; KIM, S.; SAKKIAH, S.; CAO, G. P.; LEE, Y.; LEE, K. W. Molecular modeling study for inhibition mechanism of human chymase and its application in inhibitor design. **PLoS One**, v. 8, n. 4, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0060470.
- BATSANOV, S. S. Van der Waals radii of elements from structural inorganic chemistry data. **Izvestiya Akademii Nauk. Seriya Khimicheskaya (Russian Chemical Bulletin)**, n. 1, p. 24–29, 1995.
- BAUM, K. F.; BERENS, R. L.; MARR, J. J. Purine nucleoside and nucleobase cell membrane transport in *Giardia lamblia*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 643-649, 1993.
- BHAGAVAN, N. V.; HA, C-E. **Essentials of medical biochemistry: with clinical cases**. San Diego: Elsevier Inc., 2015. p. 465-489.

BLIMAN, D.; PETTERSSON, M.; BOOD, M.; GRØTLI, M. 8-Bromination of 2,6,9-trisubstituted purines with pyridinium tribromide. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 2929-2931, 2014.

BOËNS, B.; AZOUZ, M.; OUK, T.; ZERROUKI, R. Synthesis and biological evaluation of nitrogen mustard derivatives of purine bases. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 32, n.2, p. 69-80, 2013.

CHENG, A. C.; COLEMAN, R. G.; SMYTH, K. T.; CAO, Q.; SOULARD, P.; CAFFREY, D. R.; SALZBERG, A. C.; HUANG, E. C. Structure-based maximal affinity model predicts small-molecule druggability. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 71-75, 2007.

CHOKSHI, D. A. Improving access to medicines in poor countries: the role of universities. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 6, 2006. Disponível em: <<http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.0030136>>.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2^a edição. Oxford: Oxford University Press, 2012. 1233 p.

COHEN, J.; DIBNER, M. S.; WILSON, A. Development of and access to products for neglected diseases. **PLoS One**, v. 5, n. 5, 2010. Disponível em: <<http://www.plosntds.org/article/info:doi/10.1371/journal.pntd.0001750>>.

CORDINGLEY, F. T.; CRAWFORD, G. P. *Giardia* infection causes vitamin B₁₂ deficiency. **Australian and New Zealand Journal of Medicine**, v. 16, n. 1, p. 78–79, 1986.

CRIVORI, P.; CRUCIANI, G.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B. Predicting blood-brain barrier permeation from three-dimensional molecular structure. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2204-2216, 2000.

CRUCIANI, G.; CRIVORI, P.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B. Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the VolSurf approach. **Journal of Molecular Structure: Theochem**, v. 503, p. 17-30, 2000.

CRUCIANI, G.; MENICONI, M.; CAROSATI, E.; ZAMORA, I.; MANNHOLD, R. Volsurf: a tool for drug ADME-properties prediction. In: WATERBEEMD, H.; TESTA, B.; MANNHOLD, R.; KUBINYI, H.; FOLKERS, G. **Drug bioavailability: estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004; p. 406–419.

CRUCIANI, G.; PASTOR, M.; GUBA, W. VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 29-39, 2000.

DAS NEVES, G.; KAGAMI, L.; RODRIGUES, R.; DA SILVA, V.; EIFLER-LIMA, V.; KAWANO, D. In silico design of new inhibitors of guanine phosphoribosyltransferase (GPRT) from *Giardia lamblia* as antiparasitic drug candidates. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 14, n. 1, p. 8-24, 2017.

DAVIDSON, B. L.; PALELLA, T. D.; KELLEY, W. N. Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: a single nucleotide substitution in cDNA clones isolated from a patient with Lesch-Nyhan syndrome (HPRTMidland). **Gene**, v. 68, n. 1, p. 85-91, 1988.

DE CLERCQ, E. **Clinical use of antiviral drugs: developments of medical virology**. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 1988. 413 p.

DEWICK, P. M. **Essentials of organic chemistry: for students of pharmacy, medicinal chemistry and biological chemistry**. Hoboken: John Wiley & Sons, Ltd., 2013. 710 p.

FOX, M.A.; WHITESELL, J.K. **Organic Chemistry**. 3^a edição. Sudbury: Jones & Bartlett Publishers, 2004. 1145 p.

GARDNER, T. B.; HILL, D. R. Treatment of giardiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p. 114–128, 2001.

GARRETT, N. E.; LEWTAS, J. Cellular toxicity in Chinese hamster ovary cell cultures I: analysis of cytotoxicity endpoints for twenty-nine priority pollutants. **Environmental Research**, v. 32, n. 3, p. 455-465, 1983.

GIRARD-LAURIAULT, P.; BOYD, M.J. Synthesis of manno-2,3-epoxy- β -cyclodextrin on a soluble solid support. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 2167-2170, 2002.

GRAHAM, J. Tackling the water crisis: a continuing need to address spatial and social equity. In: SELENDY, J. M. H. (ed.) **Water and sanitation related diseases and the environment: challenges, interventions and preventive measures**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011, p. 3-16.

GREIFF D. Development of cycles for lyophilization. **Developments in biological standardization**, v. 74, p. 85-92, 1992.

GUERRANT, R. L.; KOSEK, M.; MOORE, S.; LORNTZ, B.; BRANTLEY, R.; LIMA A. A. Magnitude and impact of diarrheal diseases. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 351–355, 2002.

HIROKAWA, Y.; KINOSHITA, H.; TANAKA, T.; NAKAMURA, T.; FUJIMOTO, K.; KASHIMOTO, S.; KOJIMA, T.; KATO S. Pleuromutilin derivatives having a purine ring. Part 1: new compounds with promising antibacterial activity against resistant Gram-positive pathogens. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 12, p. 3556-3561, 2008.

HOWIE, R. A.; WARDELL, J. L. Polymeric tris(μ^2 -acetone- κ^2 O:O)sodium polyiodide at 120 K. **Acta Crystallographica Section C - Crystal Structure Communications**, vol. 59, pp. m184-m186, 2003.

JACKSON, L. K.; PHILLIPS, M. A. Target validation for drug discovery in parasitic organisms. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 425-438, 2002.

KARANIS, P.; KOURENTI, C.; SMITH, H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. **Journal of Water and Health**, v. 5, n. 1, p. 1-38, 2007.

KERNS, E. H.; DI, L. **Drug-like properties: concepts, structure design and methods**. San Diego, Academic Press, 2008. 526 p.

KROEMER, R. T. Structure-based drug design: docking and scoring. **Current Protein and Peptide Science**, v. 8, p. 312-328, 2007.

KULAGOWSKI, J.; EDWARDS, C. **3,4,6,7-Tetrahydro-1H-pyrrolo[3,4-d]pyrimidine-2,5-diones and their therapeutic use**. WO n. 2009/060206 A 1, 14 May 2009.

LI, C. M.; TYLER, P. C.; FURNEAUX, R. H.; KICKS, G.; XU, Y.; GRUBMEYER, C.; GIRVIN, M. E.; SCHRAMM, V. L. Transition-state analogs as inhibitors of human and malarial hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferases. **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 6, p. 582-587, 1999.

LIU, R.; WANG, J.; TANG, W.; FANG, H. Design and synthesis of a new generation of substituted purine hydroxamate analogs as histone deacetylase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1446-1454, 2016.

MATA-CÁRDENAS, B. D.; VARGAS-VILLARREAL, J.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, H.; NAVARRO-MARMOLEJO, L.; GONZÁLEZ-GARZA, M. T.; SAID-FERNÁNDEZ, S. *In-vitro Giardia lamblia* growth inhibition by gossypol. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v. 4, n. 7, p. 361-363, 1998.

MCKINNEY, M. **Lippincott's guide to infectious diseases**. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. 384 p.

MEHLHORN, H. **Encyclopedic reference of parasitology, volume 1: biology, structure, function**. Berlin: Springer-Verlag, 2001, p. 543-545.

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

MÜLLER, J.; HEMPHILL, A.; MÜLLER, N. Treatment of giardiasis and drug resistance. In: LUJÁN, H. D.; SVÄRD, S. (Eds) **Giardia - a model organism**. New York: Springer Verlag, 2011.

MÜLLER, J.; SCHILDKNECHT, P.; MÜLLER, N. Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in *Giardia lamblia*: characterization of a novel nitroreductase (GINR2). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1781-1789, 2013.

MUNAGALA, N.; SARVER, A. E.; WANG, C. C. Converting the guanine phosphoribosyl transferase from *Giardia lamblia* to a hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 37072-37077, 2000.

MUNAGALA, N.; WANG, C. C. The pivotal role of guanine phosphoribosyltransferase in purine salvage by *Giardia lamblia*. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1073-1079, 2002.

MURRAY, P. R. S. **Principles of organic chemistry**: a modern and comprehensive text for schools and colleges. 2^a edição. Oxford: Heinemann Educational, 1977. 337 p.

NASH, T. E.; OHL, C. A.; THOMAS, E.; SUBRAMANIAN, G.; KEISER, P.; MOORE, T. A. Treatment of patients with refractory giardiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 1, p. 22-28, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) - Working group on water and health. **Technical guidance document on water-related disease surveillance**. Genebra, Suíça: OMS, 2010.

PALANIAPPAN, M.; GLEICK, P. H.; ALLEN, L.; COHEN, M. J.; CHRISTIAN-SMITH, J. SMITH, C. Water Quality. In: GLEICK, P. H. (Ed.). **The world's water volume 7: the biennial report on freshwater resources**. New York: Springer, 2012. p. 45-72.

PATRICK, G. L.; SPENCER, J. **An introduction to medicinal chemistry**. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2009. 752 p.

QUIHUI-COTA, L.; ASTIAZARÁN-GARCÍA, H.; VALENCIA, M. E.; MORALES-FIGUEROA, G. G.; LOPEZ-MATA, M. A.; VAZQUEZ ORTIZ, F. Impact of *Giardia intestinalis* on vitamin A status in schoolchildren from northwest Mexico. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 78, n. 2, p. 51-56, 2008.

RAJAGOPAL, S.; VISHVESHWARA, S. Short hydrogen bonds in proteins. **FEBS Journal**, v. 272, n. 8, p. 1819-1832, 2005.

RANA, S. V.; BHASIN, D. K.; VINAYAK, V. K. Lactose hydrogen breath test in *Giardia lamblia*-positive patients. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 2, p. 259-261, 2005.

REICHARDT, C.; WELTON, T. Solvents and solvent effects in organic chemistry. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011. 718 p.

RZEPA, H. The mystery of the Finkelstein reaction. **The Winnower**, v. 6, n. e142795.56562, 2015. Doi: <https://doi.org/10.15200/winn.142795.56562>.

SANDERSON, D. M.; EARNSHAW, C. G. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: The DEREK system. **Human & Experimental Toxicology**, v. 10, p. 261-273, 1991.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.

SCHANER, M. E.; WANG, J.; ZEVIN, S.; GERSTIN, K. M.; GIACOMINI, K. M. Transient expression of a purine-selective nucleoside transporter (SPNTint) in a human cell line (HeLa). **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 10, 1316-1321, 1997.

SHI, W.; LI, C. M.; TYLER, P. C.; FURNEAUX, R. H.; GRUBMEYER, C.; SCHRAMM, V. L.; ALMO, S. C. The 2.0 Å structure of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analog inhibitor. **Nature Structural Biology**, v. 6, n. 6, p. 588-593, 1999.

SHI, W.; MUNAGALA, N. R.; WANG, C. C.; LI, C. M.; TYLER, P. C.; FURNEAUX, R. H.; GRUBMEYER, C.; SCHRAMM, V. L.; ALMO, S. C. Crystal structures of *Giardia lamblia* guanine phosphoribosyltransferase at 1.75 Å. **Biochemistry**, v. 39, n. 23, p. 6781-6790, 2000.

SMITH, G. F. The acid-catalyzed polymerization of pyrroles and indoles. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 18, p. 287-309, 1963.

SMITH, M. B. **Organic chemistry: an acid-base approach**. Boca Raton: CRC Press, 2011. 1574 p.

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure**. 6^a edição. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007. 2356 p.

STIERAND K, MAAß P, RAREY M. Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. **Bioinformatics**, v. 22, n. 14, p. 1710-1716, 2006.

STACHOWICZ-KUŚNIERZ, A.; KORCHOWIEC, J. Nucleophilic properties of purine bases: inherent reactivity versus reaction conditions. *Structural Chemistry*, v. 27, n. 2, p. 543-555, 2016.

STOUT, J. T.; CASKEY, C. T. HPRT: gene structure, expression, and mutation. **Annual Review of Genetics**, v. 19, p. 127-148, 1985.

TROY, D. B. **Remington: the science and practice of pharmacy**. 21^a edição. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 2395 p.

TULCHINSKY, T. H.; VARAVIKOVA, E. A. **The new public health**. 2^a edição. San diego, California: Elsevier Academic Press, 2009. 672 p.

USA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Giardia: drinking water health advisory**. EPA report No. 822-R-99-008. Washington: EPA, 1999. P. 1-40.

YEE, Y. K.; BERNSTEIN, P. R.; ADAMS, E. J.; BROWN, F. J.; CRONK, L. A.; HEBBEL, K. C.; VACEK, E. P.; KRELL, R. D.; SNYDER, D. W. A novel series of selective leukotriene antagonists: exploration and optimization of the acidic region in 1,6-disubstituted indoles and indazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 33, n. 9, 2437-2451, 1990.

VAN DE WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003.

VERDONK, M.L.; COLE, J.C.; HARTSHORN, M.J.; MURRAY, C.W.; TAYLOR, R.D. Improved protein-ligand docking using Gold. **Proteins**, v. 52, n. 4, p. 609-623, 2003.

WANG, C. C.; LEE, J. C.; LUO, S. Y.; KULKARNI, S. S.; HUANG, Y. W.; LEE, C. C.; CHANG, K. L.; HUNG, S. C. Regioselective one-pot protection of carbohydrates. **Nature**. v. 446, n. 7138, p. 896-899, 2007.

ANEXOS



Recibo digital

Esse recibo confirma que o seu documento foi recebido por **Turnitin**. Abaixo você encontrará a informação do recibo referente ao seu envio.

A primeira página do seu documento está exibida abaixo.

Autor do material:	Drieli Thomasini
Título do Trabalho:	Revisão Drieli
Título do envio:	Revisão Drieli
Nome do arquivo:	Disserta_o_Drieli_Thomasini_-_28-...
Tamanho de arquivo:	1.48M
Contagem de páginas:	53
Contagem de palavras:	14,425
Contagem de caracteres:	77,605
Data de envio:	28-out-2019 10:37AM (UTC-0300)
Identificação do Envio:	1201977463



28/10/2019

Turnitin

Turnitin Relatório de Originalidade

Processado em: 28-out-2019 11:39 -02

Identificação: 1201977463

Contagem de Palavras: 14425

Enviado: 1

Revisão Drieli Por Drieli Thomasini

Índice de Semelhança

18%

Semelhança por Fonte

Internet Sources:	16%
Publicações:	9%
Documentos de Aluno:	6%

1% match (Internet a partir de 19-set-2019)

http://repositorio.unicamp.br/jsui/bitstream/REPOSIP/325748/1/Paiva_PaulaPereiraDe_D.pdf

1% match (Internet a partir de 21-set-2017)

http://tede.unioeste.br/bitstream/tede/623/1/DISERTAcO_%20Final.pdf

1% match (Internet a partir de 27-set-2019)

<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/164785/001027365.pdf?isAllowed=y&sequence=1>

< 1% match (Internet a partir de 12-jul-2018)

<https://epdf.tips/fragment-based-drug-design-volume-v493-tools-practical-approaches-and-examples-m.html>

< 1% match (Internet a partir de 03-jun-2019)

http://repositorio.unicamp.br/jsui/bitstream/REPOSIP/334053/1/PerezSanchez_Yuliana_M.pdf

< 1% match ()

<http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/volltexte/2000/156/pdf/Dissertation-Grosche.pdf>

< 1% match (publicações)

[Luciano Porto Kagami, Gustavo Machado das Neves, Ricardo Pereira Rodrigues, Vinicius Barreto da Silva et al. "Identification of a novel putative inhibitor of the Plasmodium falciparum purine nucleoside phosphorylase: exploring the purine salvage pathway to design new antimalarial drugs". Molecular Diversity, 2017](#)

< 1% match (Internet a partir de 19-set-2019)

http://repositorio.unicamp.br/jsui/bitstream/REPOSIP/330787/1/Fernandes_DaniaraCristina_D.pdf

< 1% match (documentos dos alunos a partir de 23-out-2014)

[Submitted to National University of Singapore on 2014-10-23](#)

< 1% match (Internet a partir de 13-mar-2010)

http://nzsr.rsnz.org/publish/archive/NZSR_65_1.pdf

< 1% match (Internet a partir de 25-out-2010)

http://www.biomedexperts.com/Profile.bme/1461282/Mauro_F_Valencia

< 1% match (documentos dos alunos a partir de 06-out-2008)

[Submitted to Open University on 2008-10-06](#)

< 1% match (Internet a partir de 29-jul-2019)

http://repositorio.unicamp.br/jsui/bitstream/REPOSIP/334433/1/Sobrinho_JosianeAparecida_D.pdf

< 1% match (Internet a partir de 12-set-2019)

http://repositorio.unicamp.br/jsui/bitstream/REPOSIP/334934/1/Gatti_Luana_M.pdf

< 1% match (Internet a partir de 27-abr-2016)

<http://aac.asm.org/content/45/9/2571.full>

< 1% match (Internet a partir de 17-mai-2016)

http://pt.slideshare.net/Love_Pharmacy/separao-de-aminocidos-por-cromatografia-em-4-papel

< 1% match (Internet a partir de 19-mai-2019)

<http://challengingdogma-fall2012.blogspot.com/2013/01/safe-drinking-water-changing-lives-and.html>

< 1% match (Internet a partir de 24-ago-2016)

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-66322013000100012&script=sci_arttext

< 1% match (documentos dos alunos a partir de 09-out-2019)

[Submitted to Universidade Estadual de Campinas on 2019-10-09](#)

< 1% match (Internet a partir de 25-mar-2014)

[http://file.zums.ac.ir/ebook/072-Antiparasitic%20and%20Antibacterial%20Drug%20Discovery%20-%20From%20Molecular%20Targets%20to%20Drug%20Candidates%20\(D.pdf](http://file.zums.ac.ir/ebook/072-Antiparasitic%20and%20Antibacterial%20Drug%20Discovery%20-%20From%20Molecular%20Targets%20to%20Drug%20Candidates%20(D.pdf)

< 1% match (Internet a partir de 27-abr-2010)

<http://www.nd.edu/~gmadev/bio05/ClassNotes/nrd1549.pdf>

< 1% match (documentos dos alunos a partir de 16-set-2016)

[Submitted to University of Adelaide on 2016-09-16](#)

< 1% match (Internet a partir de 31-jul-2019)

<https://www.mdpi.com/2218-273X/9/1/5/htm>

28/10/2019

Turnitin

< 1% match (Internet a partir de 06-ago-2019) https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/10533/Dissertacao_Final.pdf?isAllowed=y&sequence=3
< 1% match (Internet a partir de 15-mar-2019) http://www.lesch-nyhan.org/zh/research/mutations-database/references
< 1% match (Internet a partir de 13-abr-2019) https://www.csst.qc.ca/en/prevention/reptox/Pages/fiche-prmsd.aspx?langue=a&no_produit=2915
< 1% match (Internet a partir de 09-fev-2014) http://www.coursehero.com/file/1605135/10Chapter2/
< 1% match (Internet a partir de 03-dez-2016) http://repositorio.bc.ufg.br/tede/bitstream/tede/4259/5/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20-%20Mariana%20C%C3%B4rtes%20de%20Sousa%20-%202012.pdf
< 1% match (Internet a partir de 25-nov-2018) https://www.boris.unibe.ch/view/contributors_bern/M=FCiler=3ANorbert=3A=3A.type.html
< 1% match (Internet a partir de 18-abr-2010) http://www.diagnotek.com.br/arquivos/trabalhos/prevalencia_de_enteroparasitoses.pdf
< 1% match (Internet a partir de 12-ago-2019) http://repositorio.unicamp.br/jsui/bitstream/REPOSIP/334589/1/Silva_LeandroAfonsoDa_M.pdf
< 1% match (Internet a partir de 19-set-2019) http://repositorio.unicamp.br/jsui/bitstream/REPOSIP/330943/1/Datovo_JeanCarloDeFreitas_M.pdf
< 1% match (Internet a partir de 08-fev-2017) http://www.smarh.eng.ufmg.br/defesas/1043M.PDF
< 1% match (Internet a partir de 04-abr-2019) https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00220388.2016.1277017
< 1% match (Internet a partir de 16-out-2010) http://tcsweb3.jrc.it/documents/QSAR/EUR_24377_EN.pdf
< 1% match (Internet a partir de 18-out-2018) https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/5927/6/Tese%20-%20Kayena%20Delaix%20Zaqueo.pdf
< 1% match (publicações) Alharbi, Amjad Muawadh, "Detection of Giardia Lamblia by Using Microscopic Examination, Rapid Chromatographic Immunossay Test and Molecular Technique = الكشف عن طفيل الجيارديا لامبليا باستخدام الفحص الميكروسكوبي واختبار التلصق وموتوره في المصابيح السريع والتقنية", King Abdulaziz University : Scientific Publishing Centre, 2018
< 1% match (publicações) "Chemistry of Mustard Compounds", Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds, 2015.
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 13-mar-2019) Submitted to Manipal University on 2019-03-13
< 1% match (Internet a partir de 18-out-2018) https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/6478/3319.pdf?isAllowed=y&sequence=1
< 1% match (Internet a partir de 07-set-2018) http://www.windoc.ir/%D8%AF%D8%A7%D9%86%D9%84%D9%88%D8%AF/1000367/%D9%BE%D8%A7%DB%8C%D8%A7%D9%86%D8%A7%D9%85%D9%87-%D8%A8%D8%B1%D8%B3%DB%8C-%D8%AA%D8%BA%DB%8C%DB%8C%D8%B1%D8%A7%D8%AA-%D8%B3%D8%B7%D8%AD-%D8%B3%D8%B1%D9%85%DB%8C-%D9%87%D9%88%D8%B1%D9%85%D9%88%D9%86-%D8%A7%D9%86%D8%B3%D9%88%D9%84%DB%8C%D9%86-%D8%AF%D8%B1-%D9%85%D8%A8%D8%AA%D9%84%D8%A7%DB%8C%D8%A7%D9%86-%D8%A8%D9%87-%DA%98%DB%8C%D8%A7%D8%B1%D8%AF%DB%8C%D9%88%D8%B2%DB%8C%D8%B3-%D8%B1-%D8%B4%D9%87%D8%B1%D8%B3%D8%AA%D8%A7%D9%86-%D8%B1%D9%88%D8%AF%D8%B3%D8%B1
< 1% match (publicações) el Kouni, M.H., "Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites", Pharmacology and Therapeutics, 200309
< 1% match (Internet a partir de 10-jun-2019) http://repositorio.unicamp.br/jsui/bitstream/REPOSIP/334163/1/CerqueiraNeto_AnaCarolinaCorreial_D.pdf
< 1% match (Internet a partir de 15-dez-2016) https://boris.unibe.ch/view/divisions/DCD5A442BFE6E17DE0405C82790C4DE2.contributors_login_name.html
< 1% match (Internet a partir de 18-out-2018) https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/7603/2/GRACIELLE_SILVA_SANTANA.pdf
< 1% match (Internet a partir de 16-abr-2016) http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/218001/local_218001.pdf
< 1% match (publicações) Zhang, Jiadi, Corneliu Stanciu, Beibei Wang, Mahmud M. Hussain, Chao-Shan Da, Patrick J. Carroll, Snencer D. Dreher, and Patrick J. Walsh, "Palladium-Catalyzed Allylic Substitution with (n⁶-Arene-CH₂Z)Cr(CO)₃-Based Nucleophiles", Journal of the American Chemical Society, 2011.
< 1% match (Internet a partir de 09-jun-2015) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88984/

https://www.turnitin.com/newreport_printview.asp?eq=0&eb=0&esm=0&oid=1201977463&sid=0&n=0&m=2&svr=45&r=22.416349121957225&la... 2/15

28/10/2019

Turnitin

< 1% match (Internet a partir de 06-mai-2016) http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/download/1649/645
< 1% match (Internet a partir de 14-nov-2018) https://eodf.tips/crc-handbook-of-chemistry-and-physics-89th-edition.html
< 1% match (Internet a partir de 26-set-2019) https://epdf.pub/molecular-descriptors-for-chemoinformatics-second-edition-volume-i-alphabetical-.html
< 1% match (Internet a partir de 19-set-2017) http://tede.biblioteca.ufpb.br/bitstream/tede/8826/2/arquivototal.pdf
< 1% match (Internet a partir de 06-fev-2017) http://capes.gov.br/images/stories/download/nct/2016/Teses-Premiadas/Quimica-Caio-Oliveira.PDF
< 1% match (Internet a partir de 16-set-2017) https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/86623/garcia_jgd_me_arafcf.pdf?isAllowed=y&sequence=1
< 1% match (Internet a partir de 04-abr-2019) https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07900627.2012.668647
< 1% match (Internet a partir de 09-jul-2014) http://www.serc.iisc.ernet.in/SOI2013FinalNew.pdf
< 1% match () http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/96472
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 14-fev-2019) Submitted to Berkshire College of Agriculture on 2019-02-14
< 1% match (Internet a partir de 29-ago-2019) http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/334803/1/Toledo_IanDe_M.pdf
< 1% match (Internet a partir de 03-dez-2018) http://zu.edu.jo/UploadFile/Library/E_Books/Files/LibraryFile_91258_7.pdf
< 1% match (Internet a partir de 12-nov-2015) http://unesdoc.unesco.org/images/0015/001524/152487f.pdf
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 28-mar-2017) Submitted to Moulton College on 2017-03-28
< 1% match (Internet a partir de 23-nov-2017) https://kuscholarworks.ku.edu/bitstream/handle/1808/25375/Loh_ku_0099D_14166_DATA_1.pdf?isAllowed=y&sequence=1
< 1% match (Internet a partir de 10-abr-2019) https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/190191/001091020.pdf?isAllowed=y&sequence=1
< 1% match (Internet a partir de 14-abr-2016) http://dspace.unive.it/bitstream/handle/10579/5671/813054-1174350.pdf?sequence=2
< 1% match (Internet a partir de 21-out-2019) https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1011625728803
< 1% match (publicações) John de Jersey, "6-Oxopurine Phosphoribosyltransferase: A Target for the Development of Antimalarial Drugs", Current Topics in Medicinal Chemistry, 08/01/2011
< 1% match (publicações) Andrea V. Scorza, Michael R. Lappin, "Metronidazole for the treatment of feline giardiasis", Journal of Feline Medicine and Surgery, 2016
< 1% match (publicações) R. H. Andreatta, H. Rink, "Zur Problematik der Peptidsynthese an Trägern: Beitrag eines neuen Verfahrens mit löslichen Trägern", Helvetica Chimica Acta, 1973
< 1% match (Internet a partir de 05-set-2019) http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/334819/1/Oliveira_JessicaFernandaAffonsoDe_D.pdf
< 1% match (Internet a partir de 30-jan-2019) https://docplayer.com.br/53103077-Universidade-federal-do-ceara-faculdade-de-medicina-departamento-de-fisiologia-e-farmacologia-curso-de-pos-graduacao-em-farmacologia.html
< 1% match (Internet a partir de 28-nov-2017) http://prr.hec.gov.pk/Chapters/2586S-5.pdf
< 1% match (Internet a partir de 02-dez-2015) http://chembull.univer.kharkov.ua/archiv/2014_2/02.pdf
< 1% match (publicações) Rosalba, Thaissa Pasquali, Felipe (Andrade, Carlos Kleber Zago de), "Estudo metodológico da clivagem inesperada do grupo éster de produtos da reação de Passerini e síntese de 2,5-dicetomorfolidinas", RIUnB, 2013.
< 1% match (publicações)

28/10/2019

Turnitin

Jan Thesling, Hans Mayer. "Die Umsetzung von Gramin und verwandten Verbindungen mit aromatischen Aminen. Über die Hofmann-Martius-Umlagerung beim Methyl-phenyl-skatyl-amin". Chemische Berichte, 1954
< 1% match (Internet a partir de 11-jan-2019) https://www.abcbrasil.org.br/arquivos/whitepaper_CSE.pdf
< 1% match (Internet a partir de 15-mai-2019) http://academic.oup.com/nar/article/43/3/1370/2411824
< 1% match (publicações) Azevedo, Fernanda M. de, Carlos Roberto R. Matos, Raimundo Braz-Filho, and Leda Mathias. "Chemical Constituents and Lethality of Pseudopiptadenia Contorta (DC.) G. P. Lewis & M. P. Lima (Fabaceae) against Artemia salina Leach". Revista Virtual de Química, 2016.
< 1% match (publicações) Stefania Negri. "Waterborne Disease Surveillance: The Case for a Closer Interaction between the UNECE Protocol on Water and Health and the International Health Regulations (2005)". International Community Law Review, 2010
< 1% match (Internet a partir de 22-mar-2016) http://www.mdpi.com/2073-4360/4/1/794/pdf
< 1% match (Internet a partir de 10-mar-2016) https://ediss.uni-goettingen.de/bitstream/handle/11858/00-1735-0000-0022-5DF5-F/Doktorarbeit_Nils_F_G_Wittenberg_Veroeffentlichung.pdf?sequence=3
< 1% match (Internet a partir de 07-set-2018) http://www.scribd.com/document/334869/1/DNA-Drug_Review_2011.pdf
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 27-mar-2012) Submitted to University of Queensland on 2012-03-27
< 1% match (Internet a partir de 05-nov-2013) http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/83899/TesiFINAL_Enic.pdf.txt?sequence=2
< 1% match (Internet a partir de 23-set-2016) http://livrozila.com/doc/1530336/pdf
< 1% match (publicações) M ELKOUNI. "Purine Metabolism in Parasites Potential Targets for Chemotherapy". Recent Advances in Nucleosides Chemistry and Chemotherapy, 2002
< 1% match (publicações) Oliveira, Henrique Fernandes de(Oliveira, Carlos Augusto Costa Pires de and Sampaio, André Luiz Lopes). "Avaliação videoscópica nasal do tecido adenoideano comparando-se as posições sentada e decúbito dorsal". RIUnB, 2011.
< 1% match (Internet a partir de 18-out-2015) http://ima.uz/upload/iblock/dd2/dd2a942c2d426c0304312472649da876.pdf
< 1% match (Internet a partir de 21-set-2019) http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/314756/1/Dantas_DeyseSouza_D.pdf
< 1% match (Internet a partir de 05-mai-2016) http://bcs.sbn.org.br/imagebank/pdf/v25n4a18.pdf
< 1% match (Internet a partir de 24-mai-2016) http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/3262/1/ProcessamentoFolhasNim.pdf
< 1% match (Internet a partir de 10-out-2019) https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/137991/lazari_lm_dr_araiq_int.pdf?isAllowed=v&sequence=4
< 1% match (Internet a partir de 27-set-2019) https://www.mdpi.com/2073-4360/3/2/693/htm
< 1% match (Internet a partir de 07-abr-2019) https://pt.scribd.com/document/323871239/14022015-1955
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 27-nov-2015) Submitted to Coventry University on 2015-11-27
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 28-abr-2019) Submitted to University of East London on 2019-04-28
< 1% match (Internet a partir de 05-set-2019) http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/334869/1/Grigolo_ThiagoAugusto_M.pdf
< 1% match (Internet a partir de 19-set-2015) http://theses.saurashtrauniversity.edu/545/1/pipaliya_pv_thesis_chemistry.pdf
< 1% match (Internet a partir de 01-jul-2019) http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/334292/1/Baptista_VanessaCristina_D.pdf
< 1% match (Internet a partir de 11-out-2019) http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/335175/1/Scopell_Eupidio_M.pdf
< 1% match (Internet a partir de 12-set-2019) http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/334904/1/Gomes_RalphDaCosta_D.pdf

https://www.turnitin.com/newreport_printview.asp?eq=0&eb=0&esm=0&oid=1201977463&sid=0&n=0&m=2&svr=45&r=22.416349121957225&la... 4/15

28/10/2019

Turnitin

< 1% match (Internet a partir de 29-out-2018) http://bdtd.uftm.edu.br/bitstream/tede/522/5/Dissert%20Viviane%20A%20Silveira.pdf
< 1% match (Internet a partir de 31-ago-2013) http://www.worldvision.org.hk/news/press-releases/water-a-treasured-resource
< 1% match (Internet a partir de 09-fev-2007) http://guiadoestudante.clix.pt/exames/P_642V1_2F_2006.pdf
< 1% match (Internet a partir de 14-jan-2007) http://www.creaba.org.br/Revista/Edicao_10/ferrovias.asp
< 1% match (publicações) Jaramillo, Paula Marcela Duque(Ferreira Filho, Edivaldo Ximenes). "Produção, caracterização e aplicação biotecnológica de pectinases produzidas pelo fungo Aspergillus oryzae cultivado em casca de maracujá-amarelo". RIUnB, 2014.
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 28-out-2014) Submitted to Cardiff University on 2014-10-28
< 1% match (Internet a partir de 04-out-2019) http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/335112/1/Oliveira_AkilaLaraDe_M.pdf
< 1% match (Internet a partir de 27-mai-2019) http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/334001/1/Zeoly_LucasAndre%20_M.pdf
< 1% match (Internet a partir de 07-jun-2019) https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/178442/001063440.pdf?isAllowed=y&sequence=1
< 1% match (Internet a partir de 20-set-2019) http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/317481/1/Rebolla_MayraFrozonl_M.pdf
< 1% match (Internet a partir de 11-jan-2018) http://docplayer.com.br/33448460-Valdir-azevedo-dos-santos.html
< 1% match (Internet a partir de 18-out-2018) https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/3936/1/CLARA_RAÍSSA_FRANCA_ROCHA_LOPES.pdf
< 1% match (Internet a partir de 12-nov-2014) http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/25769/Meireles_Paola_Wolski.pdf?sequence=1
< 1% match () Faria Junior, Celio de. "Caracterização de cepas de Enterobacteriaceae resistentes a carbapenems isoladas no Distrito Federal", 2014
< 1% match (Internet a partir de 18-out-2018) http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/bitstream/riufcg/527/1/CL%20c3%81UDIA%20DOURADO%20MEDEIROS%20-%20DISSERTA%20c3%87%20c3%83O%20PPGEQ%202014..pdf
< 1% match (Internet a partir de 14-set-2016) http://2fwww.redalyc.org/BusquedaAutorPorNombre.aa?g=%22+Maria+Del+Pilar+C.+Soriano%22
< 1% match (Internet a partir de 25-abr-2008) http://www.damatta.com/?n=21&p=36
< 1% match (publicações) Grott, Suelen Cristina, Brunna Hartmann, Hercilio Higino Da Silva Filho, Regina Maura Bueno Franco, and Juliane Araújo Greinert Goulart. "Detecção de cistos de Giardia spp. e oocistos de Cryptosporidium spp. na água bruta das estações de tratamento no município de Blumenau, SC, Brasil", Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science, 2016.
< 1% match (publicações) Lombardo, Franco, R. Scott Obach, Manthena Y Varma, Rowan Stringer, and Giuliano Berellini. "Clearance Mechanism Assignment and Total Clearance Prediction in Human based upon In Silico Models.", Journal of Medicinal Chemistry.
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 19-mai-2009) Submitted to Mahidol University on 2009-05-19
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 31-jan-2019) Submitted to Universidad Estadual Paulista on 2019-01-31
< 1% match (publicações) Chung, G., "Tautomerism and isomerism of guanine-cytosine DNA base pair: Ab initio and density functional theory approaches", Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 20051007
< 1% match (publicações) Dev P. Arya, Nicholas Shaw, Hongjuan Xi. "Novel Targets for Aminoglycosides", Wiley, 2007
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 01-jun-2017) Submitted to Savitribai Phule Pune University on 2017-06-01
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 05-mar-2013) Submitted to Imperial College of Science, Technology and Medicine on 2013-03-05
< 1% match (documentos dos alunos a partir de 19-set-2011) Submitted to Universidad Estadual Paulista on 2011-09-19

28/10/2019

Turnitin

< 1% match (publicações)

Fonseca, Pâmela da Silva(Andrade, Carlos Kleber Zago de and Silva, Wender Alves da), "Síntese e caracterização de chalconas e dichalconas contendo unidades 1,2,3-triazólicas", RUnB, 2012.

< 1% match (publicações)

"Antiparasitic and Antibacterial Drug Discovery", Wiley, 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DRIELI THOMASINI PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE INIBIDORES SELETIVOS DA ENZIMA GUANINA FOSFORIBOSILTRANSFERASE DE GIARDIA LAMBLIA COMO POSSÍVEIS CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIPARASITÁRIOS CAMPINAS 2019 DRIELI THOMASINI PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE INIBIDORES SELETIVOS DA ENZIMA GUANINA FOSFORIBOSILTRANSFERASE DE GIARDIA LAMBLIA COMO POSSÍVEIS CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIPARASITÁRIOS Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas Instituto da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas Orientador: Prof. Dr. Daniel Fabio Kawano ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA DRIELI THOMASINI E ORIENTADA PELO PROF. DR. DANIEL FABIO KAWANO. CAMPINAS 2019.Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402 Thomasini, Drieli, 1992- T368p ThoPlanejamento e síntese de inibidores seletivos da enzima Guanina Fosforibosiltransferase de Giardia lamblia como possíveis candidatos a fármacos antiparasitários / Drieli Thomasini. – Campinas, SP : [s.n.], 2019. ThoOrientador: Daniel Fabio Kawano. ThoDissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Tho1. Doenças parasitárias. 2. Giardia. 3. Química farmacêutica. I. Kawano, Daniel Fabio, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. III. Título. Informações para Biblioteca Digital Título em outro idioma: Design and synthesis of new selective inhibitors of Guanine Phosphoribosyltransferase from Giardia lamblia as potential antiparasitic drug candidates Palavras-chave em inglês: Parasitic diseases Giardia Pharmaceutical chemistry Área de concentração: Ciências Farmacêuticas; Insumos farmacêuticos naturais, biotecnológicos e sintéticos Titulação: Mestra em Ciências Banca examinadora: Daniel Fabio Kawano [Orientador] Selma Giorgio Marcelo Lancellotti Data de defesa: 29-08 -2019 Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6698-4335> - Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0604420316025847> BANCA EXAMINADORA Prof. Dr. Daniel Fabio Kawano (Orientador) Prof. Dr. Marcelo Lancellotti (FCF-UNICAMP) Profa. Dra. Selma Giorgio (IB -UNICAMP) A Ata de defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade. Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna Drieli Thomasini, aprovada pela Comissão Julgadora em 29 de agosto de 2019. AGRADECIMENTOS O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Meus agradecimentos à CAPES pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho. Agradeço primeiramente à Deus, por sempre me dar coragem, força e motivação para continuar e nunca desistir dos meus sonhos. Obrigada por ter colocado tantas pessoas especiais na minha vida, pois sozinho eu jamais teria conseguido. À minha querida mãe Denise, que esteve presente em todos os momentos que precisei, dando apoio necessário e exercendo maravilhosamente seu papel de mãe por me dar tanto amor. Obrigada por todos os conselhos, por me encorajar, segurar a minha mão e me incentivar a mostrar o melhor de mim. Sinto-me orgulhosa e privilegiada por ter uma mãe tão especial. Sem você eu nada seria. À minha família, por sempre se orgulharem de mim e confiarem no meu trabalho. Ao meu namorado Bruno, por sempre me fazer acreditar que eu posso mais do que imagino e me inspira a querer ser mais que fui até hoje. Obrigada pelas palavras de incentivo e por permanecer ao meu lado. Às minhas amigas Natália Barreto, Giovana Zieri e Rafaela Pereira por aguentarem todos os meus desabafos e por me fazerem sempre acreditar que eu posso, que eu consigo, que sou capaz. Vocês são incríveis e fazem parte dessa conquista. Aos meus amigos do laboratório D-245, Xisto, Ana Thereza, Bruno, Renata, Ana Beatriz, Gonzalo, por toda ajuda, incentivo e pelos momentos divididos juntos; especialmente à Anna, por me ensinar tanto, dividir comigo as angústias, as alegrias e por se tornar uma verdadeira amiga que vou levar para a vida. Obrigada Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida e Profa. Dra. Luciana Gonzaga de Oliveira, por permitirem que esse trabalho fosse realizado e por todas as contribuições. Agradeço principalmente ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano, pela incrível dedicação e paciência, bem como o profissionalismo para que esse trabalho saísse como o planejado. Admiro muito você como professor, orientador e ser humano. Obrigada por sempre me motivar, mostrar o melhor caminho e confiar em mim até quando eu mesma não confio. Que Deus continue abençoando a sua vida e dê em dobro tudo o que fez por mim. Serei eternamente grata! Gostaria de agradecer à Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Instituto de Química, onde pude realizar este sonho que era a minha Dissertação de Mestrado. Por fim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, o meu sincero agradecimento. RESUMO Todos os anos, cerca de dois milhões de pessoas morrem por desidrataação associada à diarreia, como resultado da falta de acesso à água de qualidade e à infraestrutura sanitária. Dentre as doenças diarreicas causadas por protozoários, Giardia lamblia tem se destacado ao responsável por 40% de todos os surtos mundiais registrados em quase 50 anos. A Organização Mundial da Saúde estima que as infecções causadas por G. lamblia sejam a doença protozoária intestinal mais frequentemente relatada em todo o mundo, podendo chegar a 200 milhões de indivíduos infectados por ano. Embora existam medicamentos efetivos para o tratamento da giardíase, a existência de linhagens resistentes à praticamente todos estes medicamentos reforça o fato de que a busca por novos fármacos contra o parasita deve ser um processo contínuo, de modo a sempre garantir que o arsenal terapêutico disponível seja suficiente para tratar mesmo os pacientes intrinsecamente mais resistentes. Ao contrário dos que ocorre nos seres humanos, protozoários parasitas como G. lamblia são incapazes da síntese de novo (total) de nucleotídeos purínicos e, portanto, dependem exclusivamente de mecanismos de captação e interconversão de purinas para a sua sobrevivência. Tal processo é mediado pela enzima Guanina Fosforibosiltransferase (GPRTase) e sua inibição resulta na redução de cerca de 90% da capacidade de replicação do parasita. Portanto a GPRTase de G. lamblia representa um alvo terapêutico atrativo para o planejamento de novos fármacos capazes de combater infestações causadas pelo parasita. Neste trabalho, após comparação do sítio ativo da GPRTase com a sua enzima homóloga em seres humanos, HGPRTase, foi possível identificar um pequeno bolso hidrofóbico que, se explorado através de interações específicas com os ligantes, poderia conferir uma inibição seletiva da GPRTase, reduzindo assim possíveis eventos adversos decorrentes da inibição da HGPRTase. Ao se empregar conceitos clássicos de química medicinal como extensão de estrutura, bioisosterismo e simplificação molecular, respaldados por simulações de docking molecular e predições dos perfis farmacocinéticos in silico, foi possível idealizar compostos potencialmente ativos e seletivos a partir da estrutura de um ligante não seletivo da GPRTase, o fosfato de imucilina G. Embora a rota sintética tenha sido padronizada pela obtenção de apenas um destes análogos, esta provavelmente poderá ser integralmente aplicada à síntese de outro análogo por conta da alta similaridade estrutural entre os dois compostos. Com relação à síntese dos dois compostos remanescentes, houve tempo hábil apenas para a síntese do primeiro intermediário sintético. Os trabalhos prosseguirão no grupo visando pôr à prova a hipótese originalmente proposta, de que tais compostos poderiam inibir seletivamente a GPRTase de G. lamblia, sem causar uma inibição significativa da HGPRTase humana. ABSTRACT Every year about 2 million people die due to dehydration associated with diarrhea, a consequence of the restricted access of poor populations to potable