

REVISTA

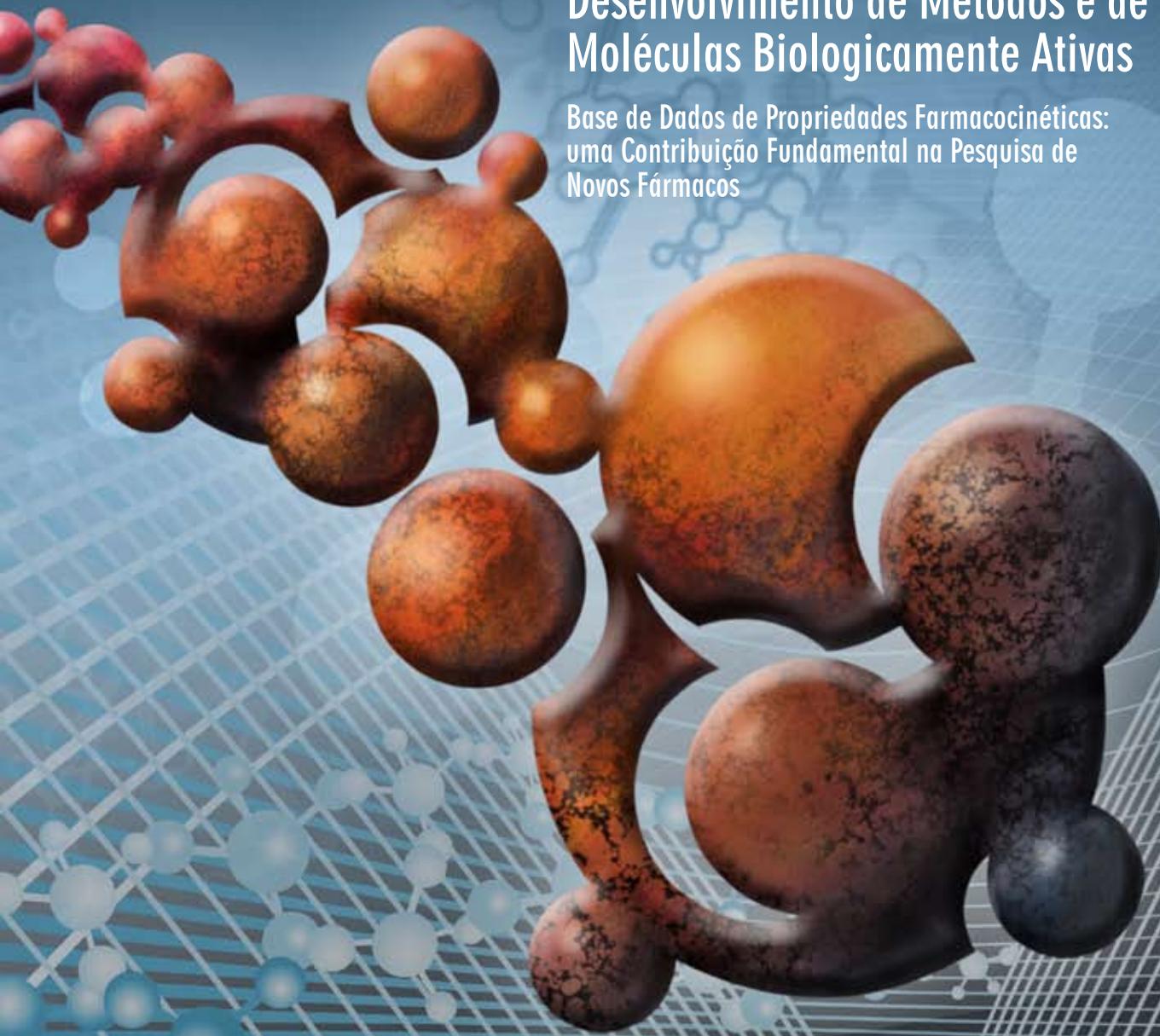
# Processos Químicos

Revista científica da Faculdade de  
Tecnologia SENAI Roberto Mange

Ano 2  
n° 3  
Jan/Jun  
2008

Aspectos da Síntese Orgânica no  
Desenvolvimento de Métodos e de  
Moléculas Biologicamente Ativas

Base de Dados de Propriedades Farmacocinéticas:  
uma Contribuição Fundamental na Pesquisa de  
Novos Fármacos





ISSN 1981-8521

REVISTA **Processos**  
**Químicos**

Revista científica da Faculdade de  
Tecnologia SENAI Roberto Mange



Goiânia, v.2, n.3, ano 2, jan/jun 2008

**Paulo Afonso Ferreira**

Presidente do Conselho Regional do SENAI

**Paulo Vargas**

Diretor Regional do SENAI

**Manoel Pereira da Costa**

Diretor de Educação e Tecnologia

**Ítalo de Lima Machado**

Gerente de Educação Profissional

**Francisco Carlos Costa**

Diretor da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange

**Joana Darc Silva Borges**

Coordenadora da Área de Química

## Corpo Editorial

Ademir João Camargo

Angelma Genaro

Anselmo Eucana de Oliveira

Carlito Lariucci

Eliane Vieira Rosa

Eurípedes de Almeida Ribeiro Júnior

Gilberto Lúcio Benedito Aquino

Guilherme Roberto de Oliveira

Hamilton Barbosa Napolitano

Joana Darc Silva Borges

José Daniel Gonçalves Vieira

Kleber Carlos Mundim

Manoel Pereira Costa

Maria Assima Bittar Gonçalves

Roberta Signini

Solemar Silva Oliveira

[www.senaigo.com.br](http://www.senaigo.com.br)

---

Revista Processos Químicos / SENAI.

Departamento Regional de Goiás - v.2,  
n.3 (jan/jun, 2008). Goiânia: SENAI/DR.

Gerência de Educação Profissional /  
Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto  
Mange, 2008.

v.: il.

Semestral

Editada pela Assessoria de Comunicação e  
Marketing do Sistema FIEG

ISSN 1981-8521

1. Educação Profissional - Periódicos. 2.  
Processos Químicos.

I. SENAI. Departamento Regional de Goiás

CDD - 540

---

Tiragem: 1.500 exemplares

**Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange**

Av. Engenheiro Roberto Mange, nº 239

Bairro Jundiá - CEP 75113-630 - Anápolis-GO

Fone: (62) 3902-6200 - Fax: (62) 3902-6226

e-mail: [revistapq.senai@sistemafieg.org.br](mailto:revistapq.senai@sistemafieg.org.br)

## ARTIGO CONVIDADO

- 09 *Aspectos da Síntese Orgânica no Desenvolvimento de Métodos e de Moléculas Biologicamente Ativas*  
David Rodrigues da Rocha, Vitor Francisco Ferreira e  
Wilson da Costa Santos

## ARTIGOS GERAIS

- 23 *Estudo Químico Quântico da Adsorção dos Gases O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> sobre a Ftalocianina de Alumínio*  
Valter H. C. Silva, Ademir J. Camargo,  
Hamilton B. Napolitano e Anselmo E. de Oliveira
- 31 *Engenharia de Proteína como Estratégia para o Estudo da Estrutura e Função de Proteínas*  
Euripedes A. Ribeiro Jr
- 46 *Cromatografia Quiral no Desenvolvimento de Novas Drogas*  
Fernando Petacci e Silvia de Sousa Freitas
- 52 *Preparação e Avaliação de Novos Nanosistemas Terapêuticos de Liberação Prolongada de Bentonita – Aciclovir*  
Flávia Almada do Carmo, Lúcio Mendes Cabral,  
Camila Braga Dornelas e Michele Villardi
- 59 *Inovação Tecnológica e Polimorfismo de Fármacos*  
Carlito Lariucci, Hamilton B. Napolitano e Silvio Cunha
- 66 *Base de Dados de Propriedades Farmacocinéticas: uma Contribuição Fundamental na Pesquisa de Novos Fármacos*  
Tiago L. Moda e Adriano D. Andricopulo
- 72 *Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana da Ciprofloxacina, Gentamicina e Ceftriaxona*  
Angelma Genaro e Carlos Alberto M. Lopes
- 78 *Gestão de Riscos na Indústria Farmacêutica*  
Wolney Cardoso da Silva

## OPINIÃO

86

*Inovação Tecnológica Industrial*

Leonardo Guerra de Rezende Guedes

88

*Planejamento de Novos Fármacos: Inovação e Integração*

Adriano D. Andricopulo

A *inovação tecnológica* é a introdução no mercado de um novo produto ou processo, ou de uma versão melhorada de um produto ou processo existente e, de forma geral, compreende: (1) as atividades internas e externas de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I); (2) a aquisição externa de PD&I e outros conhecimentos externos; (3) o projeto industrial e (4) outras preparações técnicas para a produção e a distribuição. Inovação tecnológica, portanto, pode ser vista como sinônimo de geração de riqueza para uma região, especialmente para seus Arranjos Produtivos Locais (APL) de algum segmento produtivo, e para a sociedade e suas entidades privadas e públicas.

As atividades de PD&I englobam a pesquisa em ciências básica e aplicada visando obter aplicações inovadoras, a instalação de novos processos, sistemas e serviços, e ainda a melhora substancial do que já existe ou está instalado. O Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – SENAI/GO, entidade vinculada a Federação das Indústrias do Estado de Goiás (FIEG), com a missão de promover a inovação e a transferência de tecnologias industriais, tem assumido o pensar soluções para demandas socialmente definidas de qualificação, PD&I e inovação tecnológica. Nesse contexto e compromisso, é lançado o Terceiro Volume da Revista Processos Químicos.

Para o Artigo Convidado, o Terceiro Volume aborda os aspectos da síntese orgânica no desenvolvimento de métodos e moléculas biologicamente ativas. Na seção Artigos Gerais, destaca-se o artigo “Base de Dados de Propriedades Farmacocinéticas: uma Contribuição Fundamental na Pesquisa de Novos Fármacos”, por ser uma descrição da primeira base de dados brasileira para o estudo de propriedades farmacocinéticas, batizada de PK/DB (*Database for Pharmacokinetic Properties*). Cabe destacar que esta é uma contribuição totalmente nacional, e exemplo notável de inovação tecnológica na área de PD&I de fármacos. Na seção Opinião dois artigos abordam temas como a Inovação Tecnológica Industrial e Planejamento de Novos Fármacos: Inovação e Integração. Esse último uma reflexão sobre os melhores caminhos da inovação no contexto brasileiro.

**Joana Darc Silva Borges**  
Coordenadora da Área de Química  
FATEC SENAI Roberto Mange



# Aspectos da Síntese Orgânica no Desenvolvimento de Métodos e de Moléculas Biologicamente Ativas

David Rodrigues da Rocha, Vitor Francisco Ferreira e Wilson da Costa Santos

A síntese orgânica é um dos pilares da indústria farmoquímica. Igualmente a outras áreas da ciência, avanços ocorrem rapidamente. Os processos químicos são inovados com novas reações, condições reacionais mais simples, acoplamento de reações, processos multicomponentes, novos catalisadores mais eficientes, etc. As indústrias de insumos de química fina e farmoquímicas precisam estar alerta para esta evolução, não apenas para a procura de novos fármacos, como também para os processos implantados, visando sempre a uma melhor adequação destes às novas demandas ambientais. Este trabalho procura enfatizar as questões relacionadas com as políticas industriais e como estas estão relacionadas às estratégias utilizadas no planejamento de uma síntese.

**Palavras-chave:** *síntese orgânica; métodos; farmoquímicos.*

The organic synthesis is one of the pillars of pharmaceutical industry. Also to other areas of science, advances occur rapidly. The chemical processes are improved with new reactions, simplest reactions, coupling between reactions, multi-process components, new catalysts that are more efficient and so on. The fine chemicals and pharmaceutical industries need to be aware to these developments, not only for the search for new drugs, but also to the established process, aiming always better and suitability process of the new environmental demands. This paper seeks to emphasize issues related to industrial policies and how they relate the strategies used in planning a synthesis.

**Keywords:** *organic synthesis; methods; pharmaceutical industry.*

## Aspectos Históricos

A síntese Orgânica é o ramo da química que estuda a criação e/ou a transformação de substâncias orgânicas, através de alterações químicas lógicas e racionais em um determinado substrato<sup>1</sup>. Através destas transformações lógicas, muitos químicos desenvolveram pura arte no manejo das reações para criarem estruturas moleculares complexas. Estas verdadeiras obras-sintéticas podem ser comparadas na sua beleza com famosas pinturas e esculturas expostas nos museus de arte<sup>2</sup>.

Professor E. J. Corey, Prêmio Nobel de Química em 1990, resumiu de forma brilhante o espírito da síntese orgânica e os estrategistas que trabalham na área com o texto: “Um químico sintético é mais que um lógico e estrategista. Ele é um explorador altamente influenciado a especular, imaginar e também criar. Estes elementos dão a ele um toque de artista o qual dificilmente poderia ser incluído nos compêndios dos princípios básicos de síntese. Estes elementos são reais e extremamente importantes”.

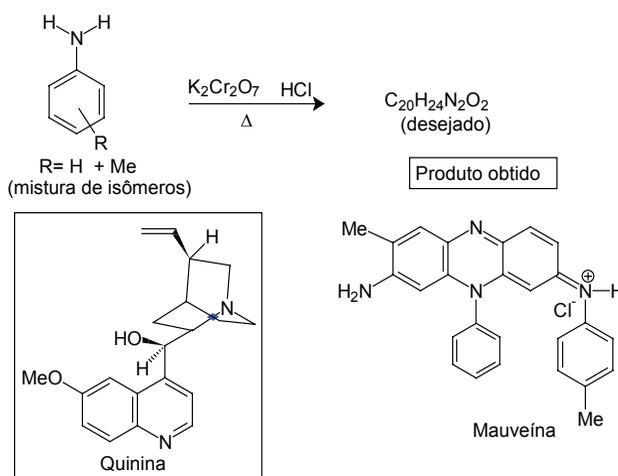
Atualmente, uma visão mais prática tem sido observada na síntese orgânica em função da importância econômica das moléculas-alvo. A síntese orgânica precisa ser praticada de forma a transcender a curiosidade intelectual e deve ser continuamente alimentada com novos métodos sintéticos que desafiem as necessidades atuais da humanidade.

Como em outras áreas das ciências naturais, a síntese orgânica nasceu da combinação entre a oportunidade e a necessidade. A síntese da uréia por F. Wöhler, em 1828, foi uma grande oportunidade para a modificação dos conceitos vigentes (postulado da força vital). Já a síntese do corante Púrpura de Mauve (mauveína e pseudomalveína) em 1856, desenvolvida por W. H. Perkin<sup>3</sup>, considerada a primeira síntese industrial, nasceu da necessidade de substituição de um corante natural de custo muito elevado (Púrpura de Tyrian), mas que era economicamente atrativo (Figura 1)<sup>4</sup>.

A síntese orgânica se desenvolveu mais rapidamente na segunda metade do século 20, pois além das necessidades das sociedades modernas serem maiores, houve também a descoberta de muitas novas reações, principalmente nas reações de formação da ligação C-C e no maior entendimento da química dos compostos

organometálicos de transição. Pode-se dividir a segunda metade do século em eras<sup>5</sup>:

- i. *Década de 50*: era das sínteses totais orientadas pelas estruturas;
- ii. *Década de 60*: era das metodologias sintéticas (ex. reações de Wittig, organocupratos, etc). Moléculas mais complexas, como por exemplo, prostaglandinas e esteróides são sintetizadas;
- iii. *Década de 70*: continua a ênfase em metodologia e estratégia biomiméticas e novas sínteses utilizando organometálicos;
- iv. *Década de 80*: ênfase no desenvolvimento de reações enantiosseletivas envolvendo catalisadores quirais, tais como a epoxidação de Sharpless, reação aldólica, a hidrogenação catalítica empregada na síntese da L-DOPA pela Monsanto e dos catalisadores quirais contendo o ligante BINAP, desenvolvido por R. Noyori. O prêmio Nobel de Química de 2001 faz justiça ao enorme avanço científico proporcionado por essas tecnologias, agradecendo os químicos William S. Knowles, R. Noyori e K. Barry Sharpless, pioneiros no uso da catálise assimétrica;
- v. *Década de 90*: continua a ênfase em síntese assimétrica, moléculas com maior número de estereocentros são preparadas em menor número de etapas. Catalisadores quirais são desenvolvidos para um grande número de reações.



**Figura 1:** Relação entre a preparação corante Púrpura de Mauve e a Quinina

Ao longo da história, muitas sínteses totais de substâncias desafiadoras marcaram a evolução da síntese orgânica, principalmente porque estas sínteses trouxeram novas metodologias de construção dos fragmentos carbônicos das moléculas. Por exemplo, já em 1904 a síntese do  $\alpha$ -terpineol e em 1917 a síntese da tropinona trouxeram uma sofisticada abordagem retrossintética.

A síntese de um alvo complexo como, ciclooctatetraeno<sup>6</sup>, tropinona<sup>7</sup> e a quinina<sup>8</sup>, foram consideradas grandes realizações da síntese orgânica na primeira metade do século (Figura 2). Cabe lembrar que nesta primeira metade do século, as únicas ferramentas analíticas e espectroscópicas disponíveis eram: o infravermelho e o ultra-violeta. O uso de aparelhos comerciais de ressonância magnética nuclear e de espectrometria de massas na pesquisa científica só foi iniciado na segunda metade da década de 60.

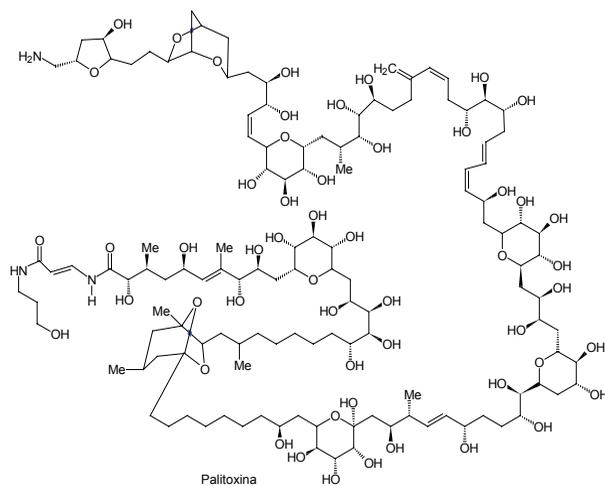


Figura 3: Estrutura da Palitoxina

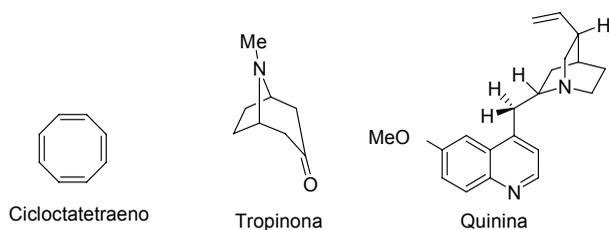


Figura 2: Exemplos de substâncias sintetizadas na primeira metade do século 20

Atualmente, a evolução da síntese alcança níveis surpreendentes, como pode ser comprovada com as sínteses da palitoxina (Figura 3) ( $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$ ,  $264 = 1,844674407371 \times 10^{19}$  estereoisômeros), que bloqueia canais de sódio. Ela foi isolada do zoantídeo *Palythoa sp.*, e é considerada uma das substâncias não-peptídicas mais tóxicas ( $DL_{50}$  em camundongo  $<100$  ng/kg) descritas na literatura. Sua síntese foi realizada por Y. Kishi e colaboradores<sup>9</sup> em 1982, mas levou muitos anos para ser completada. Outras duas estruturas complexas que selecionamos e que apresentam atividade antitumoral foram a do taxol (Figura 4), utilizada no tratamento do câncer, realizada concomitantemente pelo professores R. A. Holton e K.C. Nikolau<sup>10,11</sup> em 1994, e, mais recentemente, a (-)-Calistatina A realizada pelo grupo do Prof. L. C. Dias<sup>12</sup>.

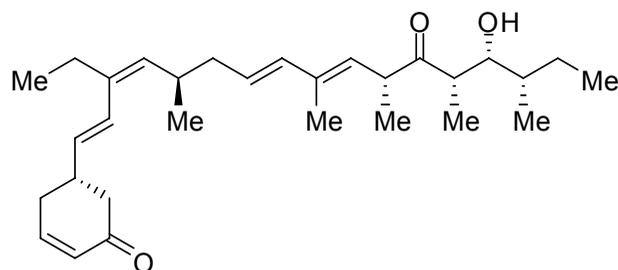
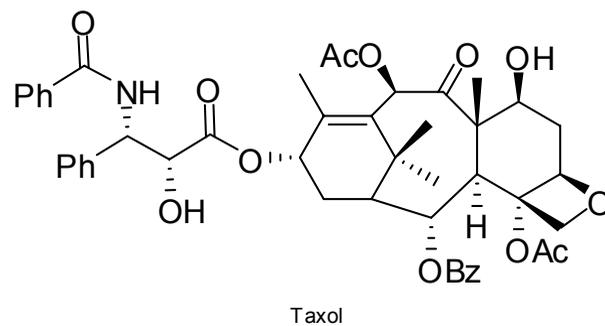


Figura 4: Estruturas do Taxol e da (-)-Calistatina A

A motivação para se desenvolver uma síntese pode estar baseada em diferentes interesses sendo que alguns são pessoais. Por exemplo, pode-se iniciar uma síntese como um desafio intelectual de desenvolver algo complexo ou porque a estrutura-alvo é bela e intrigante (arte em síntese orgânica). Na maioria dos casos, as primeiras sínteses totais de produtos naturais importantes não são eficientes e, portanto, se as substâncias são importantes do ponto de vista biológico, são necessárias rotas curtas e com reagentes baratos, e bem eficientes (praticidade). Em outras situações, são desenvolvidas sínteses buscando provar alguma propriedade intrínseca da substância (oportunidade) ou a sua estereoquímica (necessidade). Os exemplos que demonstram estes dois últimos pontos levantados estão apresentados na Figura 5.

O 1-bromotripticeno (Figura 5) foi sintetizado para se verificar a estabilidade do seu respectivo íon carbênio e, compará-lo com a estabilidade do íon carbênio gerado a partir do brometo de tritila (brometo de trifenilmetano). A periplanona é um feromônio sexual de uma espécie de barata americana (*Periplaneta americana*). Esta substância foi isolada a partir do odor emitido de 75.000 baratas fêmeas virgens (200 µg). Com esta quantidade foi impossível fazer-se a identificação estrutural completa. Então, os possíveis isômeros foram sintetizados e comparados com a periplanona natural, comprovando-se assim inequivocamente a estrutura deste feromônio.

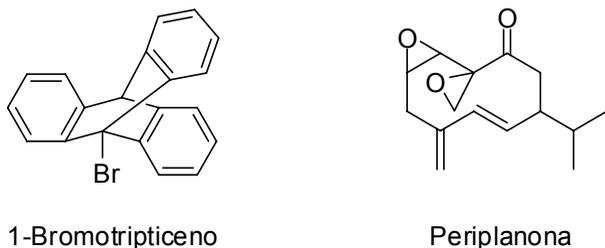


Figura 5: Exemplos de substâncias motivaram uma síntese

## A Questão Ambiental

As empresas farmoquímicas fazem parte do conjunto da sociedade e têm como objetivo promover o bem-estar da mesma, criando soluções para problemas de saúde que ainda não foram resolvidos e, portanto, deveriam estar inseridas num contexto de desenvolvimento sócio-econômico sustentável. Desta forma, e considerando

a atual conjuntura mundial, existe a necessidade de processos mais limpos. Neste aspecto, são as questões ambientais que têm direcionado a síntese orgânica para o desenvolvimento de novas reações e novos métodos, mais eficientes que os antigos<sup>13</sup>.

As novas estratégias sintéticas são muito mais elegantes e eficientes. As inovações tecnológicas nesta área estão associadas à redução do número de etapas reacionais, utilização de reagentes mais baratos, menos tóxicos, diminuição da quantidade de rejeitos gerados, etc. Entretanto, não podemos perder de vista que, em algumas situações, processos que geram menos resíduos podem ser mais caros. Tudo depende das políticas industriais e ambientais e o quanto as sociedades estão dispostas a pagar por estes processos.

Já há algum tempo, a área da Química vem trabalhando com a concepção de uma química ambientalmente mais recomendável, e que também é chamada de Química Verde<sup>14</sup>. Neste aspecto, muitas ações concomitantes precisam ser tomadas para avançar numa química sintética mais adequada ao meio ambiente, sem perder a noção da sua importância, por exemplo, na indústria farmacêutica. As ações mais adequadas para uma química limpa são, por exemplo, educação ambiental, substituição de processos químicos, eliminação de resíduos e, em último caso, o tratamento de resíduos, novos materiais poliméricos degradáveis, uso de CO<sub>2</sub> como matéria-prima em novos processos, desenvolvimento de reações sem catalisadores metálicos, reações sem solventes ou com solventes facilmente recicláveis, reflorestamento, etc. Porém, a principal necessidade é a substituição dos combustíveis fósseis (recursos não renováveis) e utilização de novas fontes energéticas<sup>15</sup>. Acredita-se que os combustíveis fósseis sejam um dos grandes responsáveis por danosos efeitos com impacto ambiental negativo, como, por exemplo, o aquecimento global. Sob esta ótica, os biocombustíveis surgem com força como viáveis alternativas ao impacto ambiental causado pelos combustíveis fósseis. Trata-se de produtos oriundos de biomassa renovável, o que os tornam únicos com relação a emissões de dióxido de carbono. Diversos produtos naturais brasileiros podem produzir biocombustíveis, o que torna o Brasil um país estratégico nesta questão<sup>16</sup>.

Outra ação importante é a substituição dos processos químicos antigos, nas indústrias farmoquímicas, por

processos mais modernos e menos agressivos ao meio ambiente. Estas ações poderiam ser enquadradas num modelo de desenvolvimento sustentável, preservacionista, no qual o dano aos recursos naturais seria reduzido, ainda que com a exploração do meio ambiente. Dentre as ações de política ambiental mais empregadas pelas indústrias farmoquímicas, podemos citar: limitações para a descarga de esgoto, regulação para emissões de partículas no ar, prevenção da poluição para resíduos tóxicos, e a avaliação de impactos ambientais<sup>17</sup>.

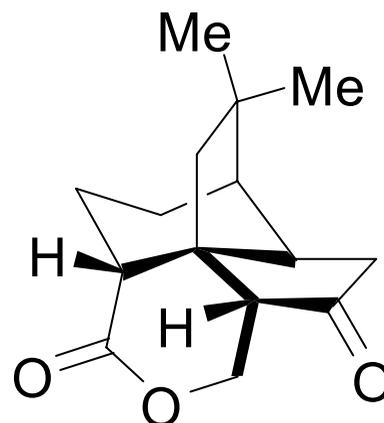
Essa postura crítica e esse conjunto de ações parecem demonstrar que há uma preocupação crescente com a necessária preservação ambiental e a exploração racional de seus recursos. Tais atitudes podem ser interpretadas como uma mudança de paradigmas e expressão de preocupações por parte das empresas. Por exemplo, a Sociedade Norte-Americana de Química estima que haja 11 milhões de substâncias químicas no mundo, das quais 80 mil utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica, e também no uso doméstico. Porém, somente cerca de 6% possui dados de toxicidade!

## Motivação

Retornando à questão da síntese orgânica, vemos que algumas substâncias foram sintetizadas dezenas de vezes. Por exemplo, a (-)-quadrona (Figura 6) foi sintetizada 16 vezes por rotas totalmente diferentes, sendo 13 na forma racêmica (+/-), duas para o enantiômero (+) e apenas uma para o enantiômero com a configuração natural (-).

Existem muitas motivações para se iniciar uma aventura sintética, mas, o que deve ser levado em consideração numa “síntese ideal”? Abaixo estão apresentados alguns pontos que podem ser considerados fundamentais na suposta “síntese ideal”:

- i. Ter rendimento total elevado;
- ii. Utilizar material de partida de baixo custo e disponível em grandes quantidades (carboidratos, terpenos, aminoácidos, intermediários abundantes oriundos das indústrias de química fina, etc);
- iii. Ser operacionalmente simples;
- iv. Etapas envolvendo multicomponentes;
- v. Ser segura e sem sub-produtos agressivos ao meio ambiente.



(-)-Quadrona

Figura 6: Estrutura da (-)-Quadrona

A eficiência em uma síntese está baseada na importância de se formarem ligações C-C ou na possibilidade de formarem anéis, e envolve os seguintes aspectos: número de reações/etapas, rendimento global, reagentes, rendimentos individuais, matérias primas e condições experimentais. Por um conceito empírico de Hendricson, a eficiência poderia levar apenas em consideração o número de reações construtivas para formar o esqueleto da molécula. Qualquer outro tipo de reação na síntese que não fosse dessa classe seriam reações complementares e, então, diminuiriam a eficiência da síntese, como proteção e desproteção. Este conceito está resumindo na representação abaixo:

$$\text{Eficiência de uma síntese} = \frac{\text{Número de reações construtivas}}{\text{Número total de reações}}$$

A química tem sido rotulada, pelos ambientalistas e pela parte leiga da população, como a causadora dos grandes problemas ambientais da humanidade. De certa forma é verdade, pois a maioria das sínteses realizadas pelas indústrias, principalmente a farmoquímica, não se preocupa com os rejeitos gerados durante o processo. A

Tabela 1 mostra claramente que a indústria farmoquímica gera cerca de 25-100 Kg de lixo químico para cada Kg de produto.<sup>18,19</sup>

Tendo em vista qual o modelo de desenvolvimento ambientalmente mais adequado ao desenvolvimento de uma nação, nunca se deve esquecer que prevenir a formação de rejeito deve vir em primeiro lugar, pois a ação de remover ou eliminar, após a sua criação, é dispendiosa e incorreta.

Em vista deste fator negativo para o meio ambiente, atualmente tem sido levado em consideração nas sínteses um fator denominado “economia de átomos<sup>18,20</sup>, ou seletividade atômica (SA)<sup>21</sup>”. Este requisito para a síntese envolve a incorporação máxima de átomos das matérias-primas no(s) produto(s).

$$SA = \frac{\text{Peso Molecular do Produto Desejado}}{\text{Soma de Todos os Pesos Moleculares de Todas as Substâncias Produzidas}}$$

Tabela 1: Produtos Industriais

Segmento Industrial	Produção Bruta (ton)
Refinamento de óleos	~0,1
Ind. Química Pesada	<1-5
Química Fina	5-50
Farmoquímica	25-100

O óxido de etileno, importante intermediário para a síntese orgânica e para o setor industrial, é produzido por epoxidação do etileno. Na primeira rota apresentada, a seletividade atômica é de 25%, ou seja, mesmo que o rendimento químico das reações seja de 100%, para cada quilograma de óxido de etileno sintetizado haverá a formação de 3 quilogramas de subproduto. A segunda rota é mais eficiente e adequada, pois a seletividade atômica é de 100%, ou seja, não há formação de subproduto (Esquema 1).

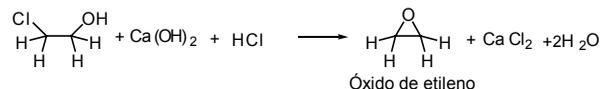
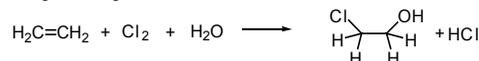
Outro exemplo interessante é a produção de metacrilato de metila, importante monômero para a produção de materiais poliméricos. A primeira rota tem uma seletividade atômica de 46%, enquanto que a rota desenvolvida pela

empresa química SHELL tem apenas uma etapa com 99% de seletividade atômica (Esquema 2).

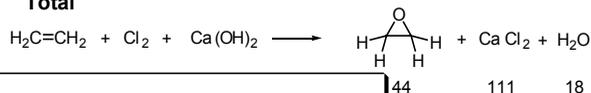
As reações processadas por via eletroquímica são muito importantes, pois apresentam alta economia atômica. O exemplo apresentado a seguir, a dimerização da acrilonitrila com adição de hidrogênio, numa célula pareada, produz a 1,4-butironitrila em alta economia atômica (Esquema 3).<sup>22</sup>

É possível criar alternativas atraentes mesmo para reações bem conhecidas. A economia atômica pode ser melhorada com o processo de separação e reutilização dos reagentes (catalisadores). O Esquema 4, representa a acetilação do álcool benzílico com uma base similar ao N,N-dimetilamino piridina (DMAP), porém o catalisador está suportado numa partícula de sílica e óxido de ferro. Esse catalisador tem propriedades magnéticas, que o permite ser separado da reação.<sup>23</sup>

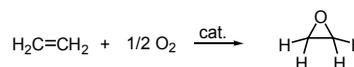
Esquema 1: Seletividades atômicas para a preparação do óxido de etileno obtido por dois processos diferentes



Total



$$\text{Seletividade Atômica} = \frac{44}{173} = 25\%$$



$$\text{Seletividade Atômica} = 100\%$$

## Planejamento

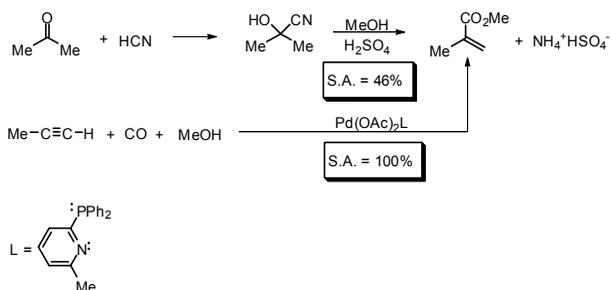
Vários fatores relacionados com a estrutura da molécula alvo podem tornar uma síntese mais complexa. Estes fatores são importantes e devem ser levados em consideração no planejamento da síntese, para que esta tenha mais chance de sucesso. Dentre estes fatores mostrados na Figura 7, o número de estereocentros é o

fator que mais aumenta a complexidade da síntese. Esta área da síntese orgânica é tratada de forma independente, conhecida como síntese assimétrica.

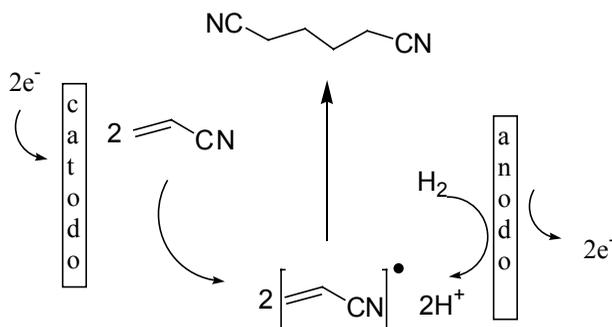
A síntese assimétrica é uma das fronteiras atuais da química orgânica que objetiva a preparação de substâncias enantiomericamente puras através da síntese exclusiva ou preferencial de um estereoisômero. Basicamente, as abordagens em síntese assimétrica devem levar em consideração a criação de estereocentros.<sup>24,25</sup>

Normalmente, a síntese assimétrica é estudada como um capítulo mais avançado no curso de síntese orgânica<sup>26,27,28</sup> que, de certa forma, segue historicamente as sínteses totais que na maioria dos casos iniciais são racêmicas (ver exemplo da (-)-quadrona).

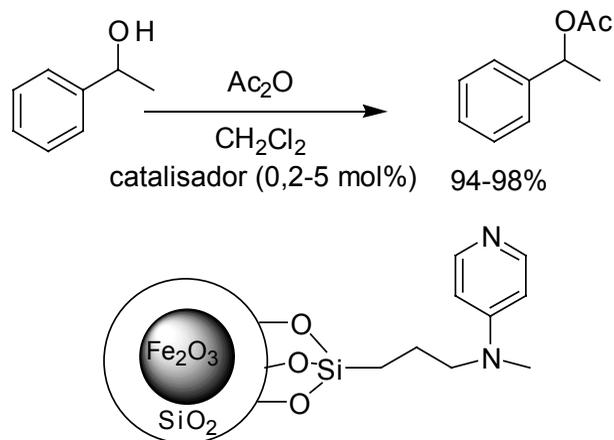
Esquema 2: Preparação do metacrilato de metila



Esquema 3: Dimerização da acrilonitrila via eletroquímica



Esquema 4: Acetilação utilizando catalisador básico com propriedades magnéticas



As abordagens utilizadas em síntese assimétrica incluem os usos de substratos quirais (“*chiron approach*”) e de substratos pró-quirais. Neste caso faz-se uso de auxiliares quirais, reagentes quirais e de catálise assimétrica. Cabe ressaltar que, em todas essas abordagens, as substâncias quirais empregadas nas sínteses (como substratos ou como auxiliares, reagentes ou catalisadores) são necessariamente produtos naturais ou seus derivados sintéticos, haja vista que, em última análise, a natureza é a única fonte de substâncias quirais. Dentre as substâncias naturais, os carboidratos, terpenos,  $\alpha$ -aminoácidos e os alcalóides, além de alguns hidroxiácidos, são as principais fontes primárias usadas em síntese assimétrica. Como exemplo, pode-se citar a L-sorbose que foi utilizada como bloco de construção quiral na síntese do *chalcogran*, ou a (-)-carvona, um monoterpene natural, que foi utilizada em várias sínteses (Figura 8).

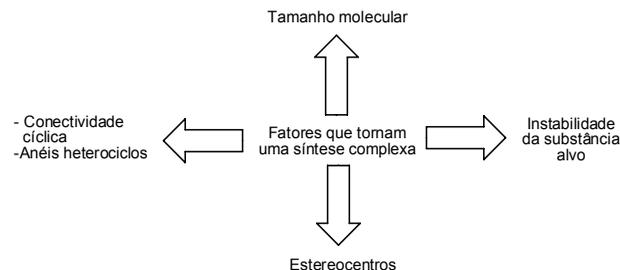


Figura 7: Fatores estruturais que podem tornar uma síntese mais complexa

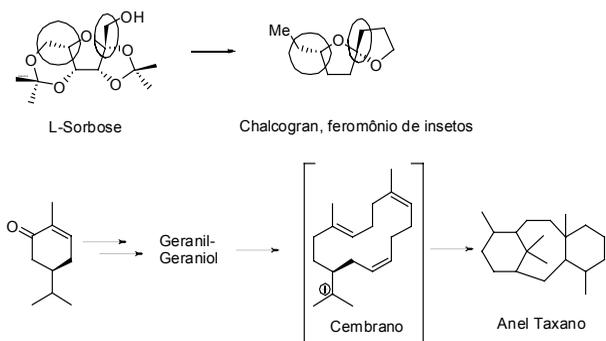


Figura 8: Sínteses assimétricas a partir de substratos quirais

Nas sínteses atuais há mais lógica aplicada no planejamento do que nas sínteses desenvolvidas no passado. Este fato pode ser atribuído à complexidade das moléculas-alvo objetivadas nas sínteses atuais. A complexidade de uma síntese aumenta devido a um ou mais fatores mostrados Figura 7, portanto, é necessário examinar um maior número de alternativas.

Após a etapa de análise da estrutura-alvo e dos possíveis fatores de complexidade contidos no alvo, vem a etapa de elaboração do plano sintético que está resumida na Figura 9. Deve-se ressaltar que na etapa de identificação das reações planejadas, algumas transformações não são ainda conhecidas. Porém, se a reação é muito desejada ela deve ser então inventada. Esta é uma situação muito comum na literatura. Muitas sínteses totais trazem no seu corpo novas transformações, e, desta forma, além da própria síntese total, aumentam-se também o conhecimentos das transformações químicas.

Existem coletâneas de reações que estão sistematizadas nos livros textos e nos artigos revisões. Nas duas últimas décadas houve uma expansão enorme de reações de aplicações gerais, inicialmente em conexão com os elementos silício<sup>29</sup>, mercúrio<sup>30</sup>, boro<sup>31</sup>, fósforo, tálio<sup>32</sup>, telúrio<sup>33,34</sup> e selênio<sup>35,36</sup>.

Desde a década de 80 os elementos dos grupos dos metais de transição dominam a área conhecida como Química dos Organometálicos de Transição na formação de ligação C-C, principalmente com os elementos paládio, níquel, ferro, cromo, molibdênio, zircônio e rutênio. Várias reações baseadas nestes elementos foram descobertas. Algumas mais relevantes estão citadas a seguir:

- i. Acoplamento de Stille com organoestanho;
- ii. Adições de Organocupratos;
- iii. Reações mediadas por metais de transição<sup>38</sup>;
- iv. Reações de formação de anel via metátesis<sup>39,40</sup>;
- v. Inserções de diazo compostos catalisadas por Rh<sup>41</sup>;
- vi. Resolução cinética<sup>42</sup>;
- vii. Adição de Michael e Anelação de Robinson<sup>43</sup>;
- viii. Adição de organometálicos;
- ix. Alquilação e acilação de Friedel-Craft;
- x. Condensação de Claisen;
- xi. Eletrociclização  $\pi$ -radicalar;
- xii. Reação aldólica<sup>44</sup>;
- xiii. Reação de  $\alpha$ -alquilação;
- xiv. Reação de Diels-Alder;
- xv. Reação de Paulson-Khand;
- xvi. Reação de Wittig e Honner-Emons;
- xvii. Rearranjos sigmatrópicos exemplificados nos rearranjos de Cope e Claisen;
- xviii. Síntese de Fisher para indóis.

Além das reações de formação de ligação C-C, deve-se ressaltar que as inserções, remoções e interconversões de grupos funcionais representam a maioria das reações envolvidas numa síntese. Em algumas situações o esqueleto carbônico já está estruturado e, desta forma, só é necessária a manipulação de grupos funcionais. Na maioria dos casos estão envolvidas as seguintes reações: redução, oxidação, halogenação, nitração, epoxidação e sililação.

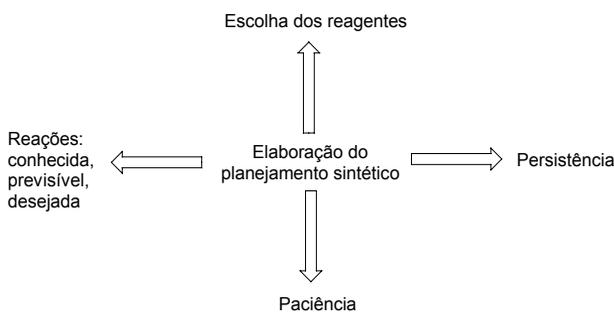
Tanto nas reações de formação das ligações C-C como nas manipulações de grupos funcionais, algumas técnicas aumentam a eficiência destas transformações e simplificam as condições experimentais. Estas técnicas são:

- i. Catálise por transferência de fases;
- ii. Reações suportadas ou catalisadas por polímeros (orgânicos e inorgânicos)<sup>45</sup>;
- iii. Reações em fase sólida;
- iv. Reações eletroquímicas<sup>46</sup>;
- v. Reações com alta pressão<sup>47</sup>;
- vi. Uso de ultrassom (sonoquímica)<sup>48</sup>;

- vii. Uso de microondas e reações fotoquímicas<sup>49,50</sup>;
- viii. Reações em líquidos iônicos<sup>51,52</sup>;
- ix. Termólise a alta temperatura em curto espaço de tempo<sup>53</sup>.

## Análise Retrossintética

No início do século (até o início da década de 50) as reações eram classificadas de acordo com o tipo de substrato no qual ocorriam as transformações, ou seja, reações do tipo substituição eletrofilica aromática, condensação envolvendo ésteres, adição à carbonila, etc. Identificar o material de partida adequado se constituía uma das maiores dificuldades dos projetos sintéticos antes da introdução do conceito de retrossíntese.<sup>54</sup>



**Figura 9:** Planejamento sintético

As sínteses eram desenvolvidas por seleção de materiais de partida que de alguma forma se assemelhassem com a substância-alvo. A escolha dos reagentes e dos caminhos sintéticos deve seguir algumas normas básicas, a saber:

- i. Análise lógica detalhada da molécula-alvo para ver se existe métodos para simplificar a molécula (remover grupos lábeis, remover grupos funcionais e estereoquímica, transformar na direção de intermediários similares; uso de grupos protetores, simetria molecular);
- ii. Identificação de subestruturas através do reconhecimento de padrões estruturais;
- iii. Maior conhecimento possível das reações químicas envolvidas (analogias e precedentes em conexão com as tecnologias atuais);
- iv. Avaliação das etapas críticas (retorno ao sistema se a solução não for adequada);
- v. Verificar se existem problemas similares resolvidos ou são necessárias inovações (novas tecnologias);
- vi. Entendimento de estereoquímica, mecanismo, reatividade das substâncias e uma boa dose de intuição, inspiração e persistência.

O fluxograma apresentado na Figura 10 mostra algumas sugestões que devem ser levadas em consideração na elaboração de um planejamento sintético.

A possibilidade de diferentes abordagens sintéticas, que procuram soluções mais viáveis, levou vários pesquisadores a realizarem diferentes rotas sintéticas para a uma mesma molécula. Existem substâncias que apresentam mais de dez sínteses descritas na literatura. O grande número de sínteses para uma mesma substância mostra que há um grande interesse econômico por ela. Na maioria dos casos, procura-se obter a substância em maior rendimento possível e em menor número de etapas. Por exemplo, a estriquinina, um importante alcalóide, teve a sua primeira síntese realizada em 27 etapas e atualmente já se pode realizá-la em 12 etapas (Figura 11). Woodward e colaboradores, em 1954, realizaram a síntese racêmica em 0,00017%<sup>8</sup>, e Bodwell, em 2002, a sintetizou na forma enantiomericamente pura (-) em 10% de rendimento. Obviamente, esta diferença reside na evolução da química orgânica sintética. Bodwell teve a sua disposição novas reações mais eficientes do que Woodward dispunha em 1954. Diminuir o número de etapas de muitas outras moléculas continua sendo o objetivo de muitos grupos de pesquisa.

A evolução da síntese orgânica de forma mais lógica foi iniciada mais sistematicamente nos trabalhos de R.B Woodward na década de 50. Em 1967 E.J. Corey introduziu o conceito de retrossíntese via *shinton*<sup>55</sup>. Esta abordagem, mais sistemática, depende mais da percepção de particularidades estruturais do que de similaridade com os materiais de partida da molécula-alvo. De fato, nesta abordagem, os materiais de partida podem não ter nenhuma relação com a substância que está sendo sintetizada. A análise retrossintética tem as seguintes vantagens:

- i. Sistematização dos procedimentos;
- ii. Simplificação da análise;

- iii. Pode ser adaptado a programas interativos mediados por computador<sup>56</sup>;
- iv. Em termos didáticos, o ensino pode ser mais bem planejado.

A retró síntese, visando ao uso de matérias-primas quirais e abundantes (síntese assimétrica), foi sistematizado por S. Hannessian que introduziu o conceito de retró síntese via *chiron* (*Chiral synthon*)<sup>57,58</sup>. O *chiron* é um fragmento quiral derivado de fonte natural ou intermediário quiral facilmente disponível. Diferentemente da abordagem via *synthon*, o *chiron* deve ser escolhido pela similaridade com a molécula-alvo e com o reagente, de modo a se utilizar o maior número de centros quirais deste, como nos casos das sínteses da biotina e da cefalosporina a partir do aminoácido L-cisteína (Figura 12). A seta dupla indica que se está trabalhando de trás para frente.

Outra forma de se pensar a retró síntese, se a

substância se tratar de um produto natural, é seguir um possível caminho biossintético de formação da substância imitando a natureza. Esta síntese é chamada de síntese biomimética ou biossintética. A grande dificuldade neste caso é que muitos caminhos biossintéticos são desconhecidos. Outras formas de se obter informações sobre possíveis fragmentos para as retró sínteses são através de degradações químicas e dados sobre as fragmentações das substâncias na espectrometria de massas.

As retró sínteses via *synthon*, via *chiron* ou biomiméticas consistem basicamente em transformar progressivamente a molécula-alvo em unidade mais simples e, se possível, em substâncias comercialmente disponíveis. A seta dupla, mostrada no esquema a seguir, indica uma desconexão. Sua direção é sempre no sentido contrário da reação ou reações propostas. Uma etapa de desconexão pode incluir mais de uma transformação química ou uma reação multicomponente.

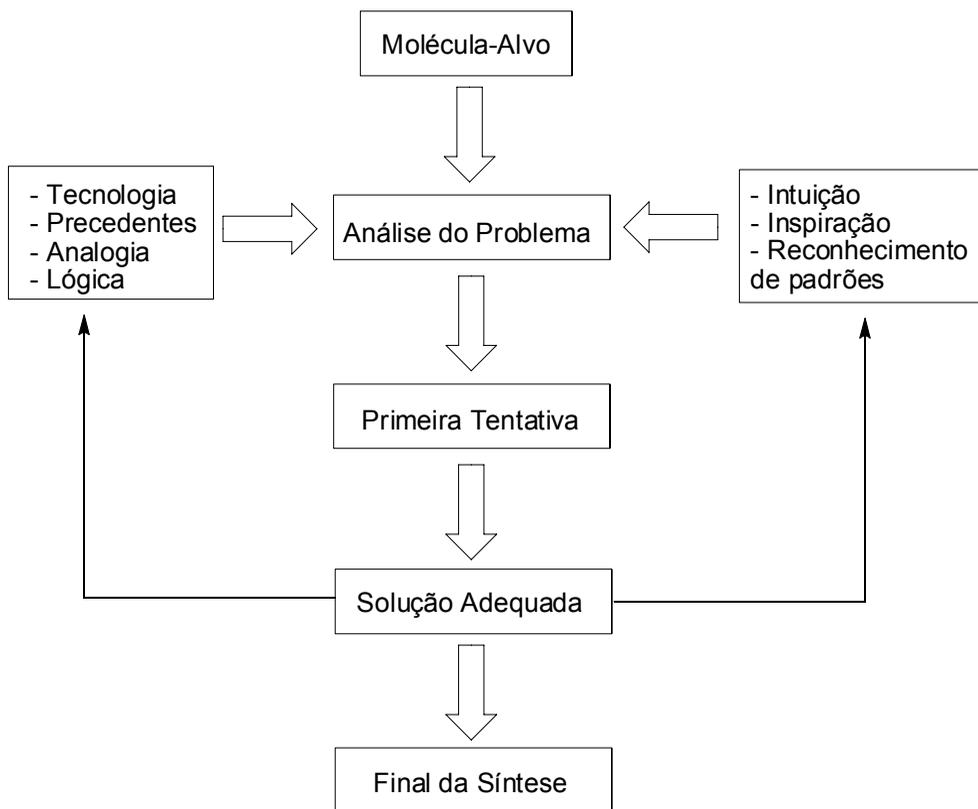
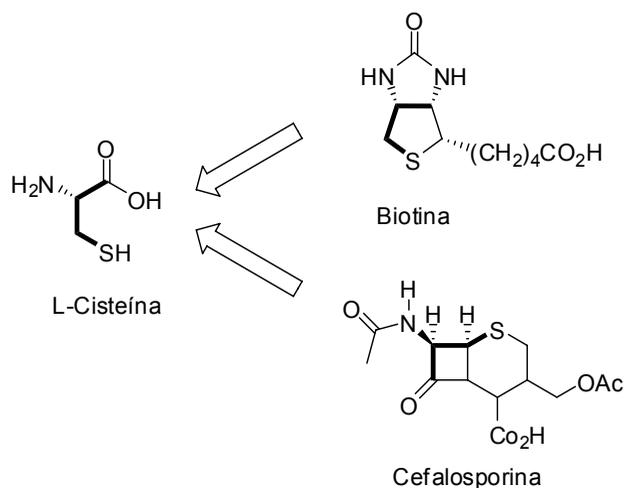
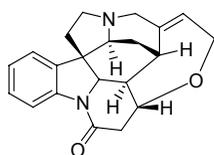


Figura 10: Fluxograma para um planejamento sintético

No Esquema 5 apresentamos dois exemplos muito interessantes de reações multicomponentes, sendo que no primeiro apresenta-se uma reação dominó assimétrica de multicomponente utilizando um organocatalisador quirais<sup>59</sup>. A complexidade estrutural nos esqueletos carbônicos, economia atômica e a variação estrutural são as características mais relevantes deste tipo de reação, principalmente quando se busca novas estruturas químicas com atividade farmacológica promissora<sup>60</sup>.



P. Magnus  
(27 etapas, 1992)



R.B. Woodward  
(27 etapas, 1954)

L.E. Overman  
(20 etapas, 1993)

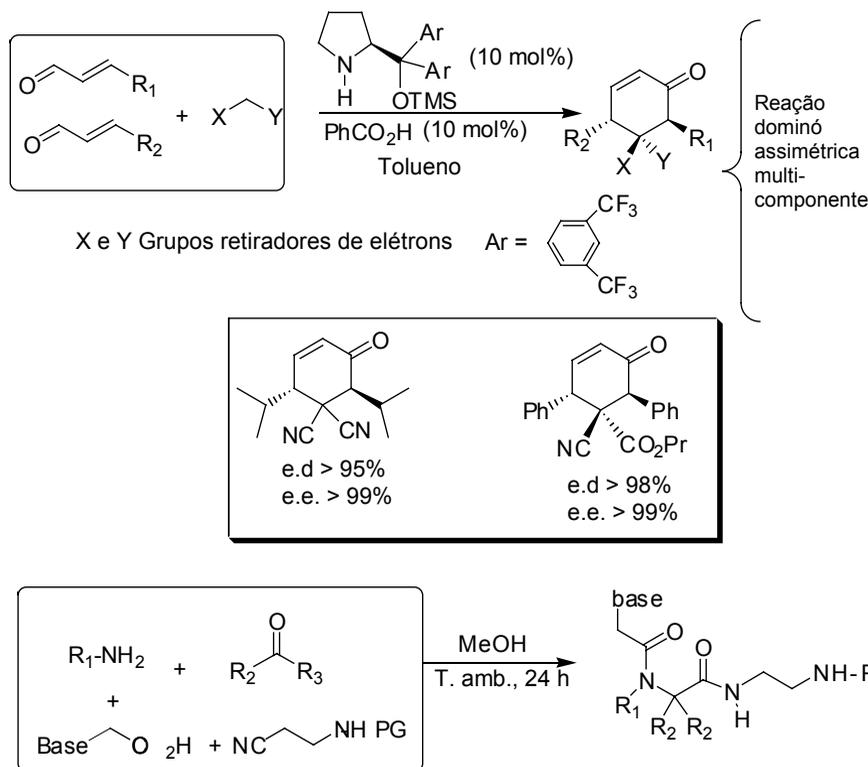
Estriquinina

M.E. Kuehne  
(19 etapas, 2002)

Figura 11: Algumas sínteses realizadas para a estriquinina

Figura 12: Sínteses tendo a L-cisteína como chiron

Esquema 5: Reações multicomponentes mostrando diversidade e complexidade



## Considerações Finais

Após esta breve digressão sobre aspectos da síntese orgânica e a sua relação com a produção de insumos e fármacos pelas indústrias, pode-se fazer alguns prognósticos a respeito do seu futuro para os próximos anos. Sem dúvida nenhuma, a síntese orgânica continuará desempenhando papel fundamental na preparação de novas substâncias que aumente a expectativa de vida para a humanidade. Em termos científicos pode-se especular que tenhamos grande desenvolvimento nas seguintes áreas: maior uso de sínteses enzimáticas com biocatalisadores; desenvolvimento da química combinatorial<sup>61</sup> para descoberta de novas drogas e novos materiais; sínteses especialmente desenhadas para atividades biológicas desejadas; sínteses mais eficientes e mais curtas; desenvolvimento de catalisadores mais eficientes; uso de técnicas reacionais menos agressivas ao meio ambiente.<sup>62</sup>

Sejam quais forem os rumos que sejam dados às buscas por novos fármacos, a síntese orgânica continuará tendo papel central. Porém, os processos antigos de produção de fármacos em uso devem ser revistos e otimizados, buscando outros processos mais sintonizados com os graves problemas ambientais atuais.

## REFERÊNCIAS

1. a) Lindberg, T.; *Strategies and Tactics in organic synthesis*; Editor. Academic Press, Orlando, **1975**; b) Bindraanel, J. S.; Bindra, R.; *Criativity in organic synthesis*; Academic Press; NY, **1975**; c) Carruthers, W.; S. Hirzel; *Some modern methods of organic synthesis*; 3rd Ed.; Stuttgart, **1984**; d) Fuhrhop, J.; Penzlin, G.; *Organic synthesis*; Verlag Chemie; Weinheim, **1983**; e) Smith, M.B.; *Organic synthesis*; McGraw-Hill; NY, **1994**; f) Fleming, I.; *Selected Organic Synthesis*; Jonh Willey & Sons, London, **1973**.
2. Markó, I.E.; *Science* **2001**, *294*, 1842-1843.
3. Perkin, W. H.; *J. Chem. Soc.* **1862**, 230.
4. Esta descoberta foi ao acaso, pois na realidade Perkin queria sintetizar a quinina, alcalóide natural e com atividade antimalárica, da qual ele só conhecia a fórmula molecular  $C_{20}H_{24}N_2O_2$ .
5. Correia, C.R.D.; Costa, P.R.R.; Ferreira, V.F.; *Quím. Nova* **2002**, *25* (sup.) 74-81.
6. Willstätter, R.; Waser, Ernst; *Ber. Deutschen Chem. Gesellschaft* **1911**, *44*, 3423-3445.
7. Robinson, R.; *J. Chem. Soc., Transaction* **1917**, *III*, 762-768.
8. Woodward, R.B.; Cava, M.P.; Ollis, W.D.; Hunger, A.; Däniker, H.U.; Schenker, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 4749-4751.
9. a) Armstrong, R. W.; Beau, J.-M.; Cheon, S. H.; Christ, W. J.; Fujioka, H.; Ham, W.-H.; Hawkins, L. D.; Jin, H.; Kang, S. H.; Kishi, Y.; Martinelli, M. J.; McWhorter Jr., W. W.; Mizuno, M.; Nakata, M.; Stutz, A. E.; Talamas F. X.; Taniguchi, M.; Tino, J. A.; Ueda, K.; Uenishi, J.; White, J. B.; Yonaga, M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7530; Suh, E. M.; Kishi, Y.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11205; b) Berlink, R. G. S.; <http://www.sbq.org.br/PN-NET/causo2.htm>
10. A síntese do taxol teve uma disputa extremamente controversa quanto ao detentor do mérito de “primeira síntese total” e envolveu os grupos dos profs. Holton e Nicolaou.
11. Holton, R. A.; Somoza, C.; Kim, H.-B.; Liang, F.; Biediger, R. J.; Boatman, P. D.; Shindo, M.; Smith, C. C.; Kim, S.; Nadizadeh, H.; Suzuki, Y.; Tao, C.; Vu, P.; Tang, S.; Zhang, P.; Murthi, K.; Gentile, L. N.; Liu, J. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1597; *ibid* **1994**, *116*, 1599; Nicolaou, K. C.; Yang, Z.; Liu, J. J.; Ueno, H.; Nantermet, P. G.; Guy, R. K.; Claiborne, C. F.; Renaud, J.; Couladouros, E. A.; Paulvannan, K.; Sorensen, E. J.; *Nature* **1994**, *367*, 630.
12. Dias, L.C.; Meira, P.R.R.; *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 4762-4773.
13. Sanseverino, A.M.; *Quím. Nova* **2000**, *23*, 102-107.
14. Lenardão, E.J.; Freitag, R.A.; Dabdoub, M.J.; Batista, A.C.F.; Silveira, C.C.; *Quím. Nova* **2003**, *26*, 123-129.
15. Ferreira, V. F.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 255.
16. Ribeiro, S. K.; EF.; *Scientific American Brasil*, edição **53**, outubro/2006.

17. Estratégia Global da Biodiversidade – diretrizes de ação para estudar, salvar e usar de maneira sustentável e justa a riqueza biótica da Terra. Programa das Nações Unidas para o meio Ambiente, **1992**.
18. Dupont, J.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 825-831.
19. Sheldon, R.A.; *J. Mol. Catal.* **1996**, *107*, 75-83.
20. Merat, L.M.O.C.; San Gil, R.A.S.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 779-781.
21. Trost, B. M.; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 259-281; C. R. D. Correia, P.R.R. Costa, V. F. Ferreira, *Quim. Nova* *25* (supl. 1) 82 (2002).
22. Paddon, C.A.; Atobe, M.; Fuchigami, T.; He, P.; Atts, P.; Haswell, S.J.; Pritchard, G.J.; Bull, S.D.; Marken, F.; *J. Appl. Electrochem.* **2006**, *61*, 617-634.
23. Dlaigh, C.; Corr, S.A.; Gunko, Y.; Connon, S.J.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4329-4332.
24. Pinheiro, S.; Ferreira, V. F.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 312-318.
25. a) Trost, B.M.; *Stereocontrolled Organic Synthesis: A Chemistry for the 21st Century*; Blackwell, Oxford, **1994**; b) Davies, S. G.; Brown, J. M.; Pratt, A. J.; Fleet, G.; *Chemistry in Britain* **1989**, 259.
26. Aitken, R.A.; Gopal, J.; *Asymmetric Synthesis*; Aitken, R.A.; Kilényi, S. N.; Editors, Blackie Academic & Professional, London **1994**, cap.4.
27. Seoane, C.; *Teaching organic synthesis: Why, how, what?*; *Aldrichimica Acta* **1989**, *22*, 41-46.
28. As sínteses ditas assimétricas, pelo conceito apresentado por Eliel, são sínteses de substâncias quirais feitas *de novo* a partir de uma substância aquiral. Quanto às sínteses ditas estereosseletivas são aquelas onde o pesquisador parte de um substrato quiral e realiza a síntese do produto desejado.
29. Colvin, E.; *Silicon in organic synthesis*; Butterworths, London, **1981**.
30. Larock, R. C.; *Organomercury compounds in organic synthesis*; Springer Verlag; NY, **1985**.
31. Brown, H. C.; *Organic synthesis via borane*; Wiley; NY, **1985**.
32. Ferraz, H. M. C.; *Quim. Nova* **1989**, *12*, 155-165; Ferraz, H. M. C.; Ribeiro, C. M. R.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 88-95.
33. Comasseto, J. V.; *Quim. Nova* **1993**, *16*, 138-148.
34. Ferraz, H. M. C.; Comasseto, J. V.; de Borba, E. B.; *Quim Nova* **1992**, *15*, 298-301.
35. Comasseto, J. V.; Ferreira, J. T. B.; do Canto, M. M.; *Quim. Nova* **1979**, *2*, 58-79.
36. Liotta, D.; *Organoselenium Chemistry*; Wiley, NY, **1981**.
37. a) Negishi, E.; *Organometallic in organic synthesis*; Wiley, NY, **1980**; b) Pearson, J.; *Metallo-organic chemistry*; Wiley, NY, **1985**; c) Davies, S. G.; *Organotransition metal Chemistry: application to organic synthesis*; Pergamon Press, Oxford, **1982**.
38. Catellani, M.; Motti, E.; Della Ca, N.; Ferraccioli, R.; *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 4153-4165.
39. Ferreira, V. F.; da Silva, F. C.; *Quim. Nova na escola* **2005**, *22*, 3-9.
40. Clavier, H.; Grela, K.; Kirschning, A.; Mauduit, M.; Nolan, S.P.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6786-6801.
41. Davies, H. M. L.; Beckwith, R. E. J.; *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2861-2903.
42. Kizirian, J.-C.; *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 140-205.
43. Gawley, R. E.; *Synthesis*, **1976**, 777-794.
44. Guillena, G.; Najera, C.; Ramon, D.J.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2249-2293.
45. *Preparative chemistry using supported reagents*; P. Laszlo Ed.; Academic Press, NY, **1987**.
46. Kyriakon, D. K.; *Electrocatalysis for organic synthesis*; Wiley, NY, **1986**.
47. Watanabe, M.; Sato, T.; Inomata, H.; Smith Jr., R. L.; Arai, K.; Kruse, A.; Dinjus, E.; *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5803-5821.
48. Li, J. T.; Wang, S. X.; Chen, G. F.; Li, T. S.; *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 415-436.
49. Dallinger, D.; Kappe, C. O.; *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2563-2591.

50. Svoboda, J.; König, B.; *Chem Rev.* **2006**, *106*, 5419-5430.
51. Pârvulescu, V. I.; Hardacre, C.; *Chem Rev.* **2007**, *107*, 2615-2665.
52. Greaves, T. L.; Drummond, C. J.; *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 206-37.
53. Brown, R. F. C.; *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *61*, 1156-1165.
54. Corey, E. J.; Cheng, X.-M.; *The logic of Chemical Synthesis*; Wiley, NY, **1989**.
55. Corey, E. J.; *Pure & Appl. Chem.* **1967**, *14*, 19.
56. E.J. Corey e colaboradores desenvolveram também o primeiro programa de análise retrossintética mediado por computador que foi chamado de OCSS (Organic Chemical Simulation for Synthesis).
57. Hanessian, S.; Franco, J.; Larouche, B.; *Pure & Appl. Chem.* **1990**, *62*, 1887-1910.
58. Hanessian S. *The Total Synthesis of Natural Products: The Chiron Approach*; Pergamon Press: New York, **1983**.
59. Carlone, A.; Cabrera, S.; Marigo, M.; Jørgensen, K.A.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1101-1104.
60. a) A. Dömling; *Curr. Opinion Chem. Biol.* **2002**, *6*, 306-313. b) Ulaczyk-Lesanko, A.; Hall, D.G.; *Curr. Opinion Chem. Biol.* **2005**, *9*, 266-276.
61. Furlán, R. L. E.; Labadie, G. R.; Pellegrinet, S. C.; Ponzio, V. L.; *Quim. Nova* **1996**, *19*, 411-422
62. Ferreira, V.F.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 165.

---

## David Rodrigues da Rocha<sup>1</sup>, Vitor Francisco Ferreira<sup>\*1</sup>, Wilson da Costa Santos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Outeiro de S. João Batista s/n Centro 24020-150, Niterói, RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia e Administração Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, R. Mário Viana 523, Santa Rosa 24241-000, Niterói, RJ, Brasil.

\*E-mail: cegvito@vm.uff.br

# Estudo Químico Quântico da Adsorção dos Gases $O_2$ e $H_2$ sobre a Ftalocianina de Alumínio

Valter H. C. Silva, Ademir J. Camargo, Hamilton B. Napolitano e Anselmo E. de Oliveira

Visando o desenvolvimento de novos materiais que possam ser utilizados na construção de sensores químicos seletivos para o oxigênio e dispositivos armazenadores de hidrogênio, cálculos teóricos DFT/B3LYP/6-31G(d) foram realizados nos complexos  $[AlPc]^+$ ,  $[AlPc]^0$ ,  $[(O_2)AlPc]^+$ ,  $[(O_2)AlPc]^0$ ,  $[(H_2)AlPc]^+$  e  $[(H_2)AlPc]^0$  com o programa Gaussian03. Os resultados mostram que há uma forte adsorção do  $O_2$  na AlPc, tanto no estado oxidado (-44,62 Kcal/mol) quanto no estado reduzido (-108,71Kcal/mol). Essa adsorção química leva a alterações estruturais e eletrônicas da AlPc que possibilita a sua utilização na construção de um sensor químico seletivo para a detecção de  $O_2$ . A adsorção física do  $H_2$  mostra que a AlPc pode ainda ser usada no desenvolvimento de dispositivos armazenadores de  $H_2$ .

**Palavras Chaves:** *ftalocianina de alumínio; oxigênio; hidrogênio; adsorção; DFT.*

Aiming a development of new materials suitable to building a selective chemistry sensors for oxygen and storing devices of the hydrogen, the theoretical calculations DFT/B3LYP/6-31G(d) were carried out to complexes  $[AlPc]^+$ ,  $[AlPc]^0$ ,  $[(O_2)AlPc]^+$ ,  $[(O_2)AlPc]^0$ ,  $[(H_2)AlPc]^+$  and  $[(H_2)AlPc]^0$  through Gaussian03. The results show a strong adsorption of  $O_2$  by AlPc in both oxidated state (-44,62 Kcal/mol) and reduced state (-108,71Kcal/mol). The chemistry adsorption takes a structural and electronic changes of AlPc which makes possible its utilization to building the selective chemistry sensors for detection of  $O_2$ . Also the physical adsorption of  $H_2$  shows AlPc suitable for development of the storing devices of  $H_2$ .

**Keyword:** *aluminum phthalocyanines; oxygen; hydrogen; adsorption; DFT.*

## Introdução

Desde sua descoberta e a identificação da sua estrutura no início do século passado, as ftalocianinas (Pc) vêm despertando grande interesse em aplicações nas áreas tecnológicas e farmacológicas devido, principalmente, às suas propriedades como alta absorção na região do Infravermelho próximo, presença de um sistema de elétrons  $\pi$  altamente conjugado, o que confere uma alta estabilidade térmica e química<sup>1,2,3,4,5,6</sup>. Entre as aplicações destacam-se a utilização das ftalocianinas na construção de sensores químicos e potencial aplicação no tratamento de vários tipos de cânceres, doenças infecciosas, visuais e neurodegenerativas. Dentre essas aplicações, o tratamento do câncer é o mais promissor e está relacionado à terapia fotodinâmica (PDT)<sup>1,7,8,9</sup>. Essa técnica baseia-se no princípio da interação da radiação eletromagnética com comprimento de onda específico com as ftalocianinas (fotossensibilizadores), fazendo com que haja fluorescência das mesmas, possibilitando a localização e o delineamento de tumores, ou ainda interagindo com o oxigênio e levando à produção de espécies reativas que são capazes de inviabilizar células e matar microorganismos. Além dessas aplicações, as ftalocianinas são utilizadas como materiais semicondutores, fotocondutores em mostradores eletrocromico e materiais de gravação ótica<sup>5,6,10,11,12</sup>.

O presente trabalho tem como objetivo o estudo teórico das propriedades eletrônicas e estruturais dos complexos formados pela adsorção de moléculas de oxigênio e hidrogênio na ftalocianina de alumínio (AlPc).

## Procedimento Computacional

O átomo de alumínio possui estado de oxidação +3 e a ftalocianina é considerada como um diânion ( $Pc^{2-}$ ). A estrutura geométrica e a nomenclatura adotada encontram-se ilustradas na Figura 1. Os cálculos foram realizados com o programa Gaussian03<sup>13</sup> utilizando-se a teoria do funcional da densidade (DFT) com funcional de troca e correlação híbrido B3LYP<sup>14</sup> e o conjunto de funções de base 6-31G(d).

A caracterização dos estados estacionários foi feita através do cálculo das frequências harmônicas vibracionais com o mesmo nível de teoria usado nas

otimizações. Os cálculos dos erros devido à superposição das funções de bases (BSSE) foram realizados usando o método de counterpoise<sup>15,16</sup> e a análise populacional empregada foi a de Mulliken<sup>17</sup>

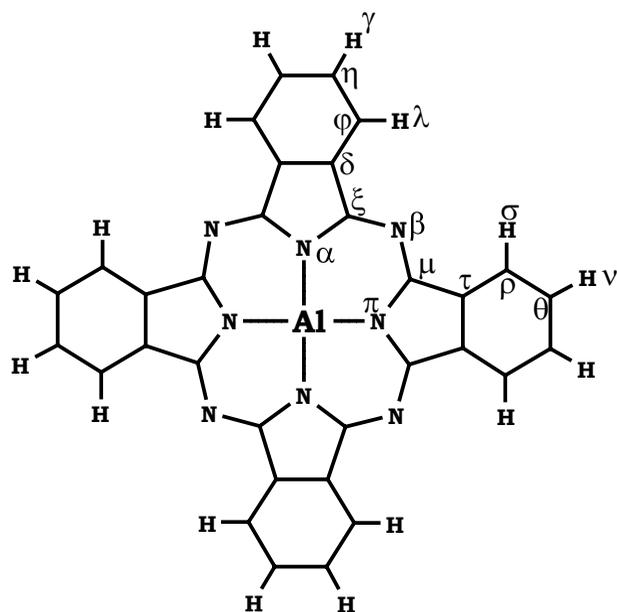


Figura 1: Ftalocianina de Alumínio ilustrando a nomenclatura usada.

## Resultados e Discussões

### COMPLEXOS $[AlPc]^+$ , $[AlPc]^0$ , $[(H_2)AlPc]^+$ e $[(H_2)AlPc]^0$

Os parâmetros geométricos das ftalocianinas de alumínio (Figura 2) sem gases adsorvidos e com os gases  $O_2$  e  $H_2$  adsorvidos nos estados reduzidos (carga total zero) e oxidados (carga total +1) são mostrados na Tabela 1. A análise dos dados mostra que a ftalocianina de alumínio no estado oxidado  $[AlPc]^+$  apresenta geometria planar, com simetria  $D_{4h}$  (Figura 2a). No estado reduzido, i.e., quando a carga sobre o sistema é zero, observam-se significativas alterações geométricas. A principal alteração é a projeção do átomo de Al para fora do plano molecular em 0,56 Å.

Os dados calculados ainda revelam um aumento de 0,1 Å no comprimento da ligação Al---N<sup>α</sup>, sugerindo um enfraquecimento dessa ligação no estado reduzido. Com exceção de uma ligeira diminuição de 1,35° do ângulo Al---N<sup>α</sup> - C<sup>ξ</sup> (ver Tabela 1), os demais parâmetros geométricos não são significativamente alterados com a redução do complexo oxidado [AlPc]<sup>+</sup>. A distância Al--H<sub>2</sub> é de 3,202 Å para o complexo [(H<sub>2</sub>)AlPc]<sup>+</sup> e 3,544 Å para o complexo reduzido [(H<sub>2</sub>)AlPc]<sup>0</sup>. Observa-se que a distância Al---H<sub>2</sub> é 0,342 Å maior no complexo reduzido do que no complexo oxidado. Esses resultados sugerem que a adsorção do gás hidrogênio na AlPc é de natureza física, pois a distância é muito grande para caracterizar uma adsorção química. Além disso, a adsorção física é mais forte no estado reduzido (-0,64 kcal/mol) do que no estado oxidado (-0,25 kcal/mol). A adsorção do H<sub>2</sub> não modifica os parâmetros geométricos da AlPc tanto no estado oxidado quanto no estado reduzido (Tabela 1 e Figura 2e e 2f).

As ordens de ligação calculadas entre Al---N<sup>α</sup> são 0,40 (estado oxidado) e 0,29 (estado reduzido), Tabela 2, o que representa uma diminuição de 27,5% na ordem de ligação decorrente da redução do complexo AlPc. Isso mostra que essa ligação é mais polarizada no estado reduzido. As ordens de ligação entre o hidrogênio e o alumínio nos complexos (H<sub>2</sub>)AlPc reforçam a hipótese da adsorção física, pois apresentam valores insignificantes (~0,01).

Os resultados da análise populacional de Mulliken constam da Tabela 3. Observa-se que o átomo de alumínio apresenta uma carga bastante positiva, com valores variando de 0,58 [AlPc]<sup>0</sup> a 0,98 [AlPc]<sup>+</sup>. Esse resultado mostra que uma parte considerável da carga adquirida pelo complexo AlPc ao ser reduzido fica nas imediações do átomo de alumínio. Nota-se que a carga do alumínio no complexo [H<sub>2</sub>AlPc]<sup>0</sup> é 0,91, o que contraria a intuição química, pois se espera um valor similar ao observado no complexo [AlPc]<sup>0</sup>.

**Tabela 1:** Comprimento de ligação (Å) e ângulos de ligação (em graus) calculados para os complexos [AlPc]<sup>+</sup>, [AlPc]<sup>0</sup>, [(O<sub>2</sub>)AlPc]<sup>+</sup>, [(O<sub>2</sub>)AlPc]<sup>0</sup>, [(H<sub>2</sub>)AlPc]<sup>+</sup> e [(H<sub>2</sub>)AlPc]<sup>0</sup> com DFT/B3LYP/6-31G\*.

	[AlPc] <sup>+</sup>	[AlPc] <sup>0</sup>	[(O <sub>2</sub> )AlPc] <sup>+</sup>	[(O <sub>2</sub> )AlPc] <sup>0</sup>	[(H <sub>2</sub> )AlPc] <sup>+</sup>	[(H <sub>2</sub> )AlPc] <sup>0</sup>
X* - Al	.....	.....	1.893	1.832	3.202	3.544
Al - Plano	0.000	0.559	0.327	0.430	0.000	0.000
Al - N <sup>α</sup>	1.922	2.020	1.954	1.977	1.922	1.929
N <sup>α</sup> - C <sup>ξ</sup>	1.398	1.380	1.388	1.383	1.398	1.398
C <sup>ξ</sup> - N <sup>β</sup>	1.318	1.324	1.321	1.321	1.318	1.338
C <sup>ξ</sup> - C <sup>δ</sup>	1.444	1.454	1.453	1.452	1.444	1.427
C <sup>δ</sup> - C <sup>φ</sup>	1.398	1.396	1.394	1.396	1.398	1.406
C <sup>φ</sup> - C <sup>η</sup>	1.392	1.393	1.397	1.393	1.391	1.384
C <sup>η</sup> - H <sup>γ</sup>	1.086	1.086	1.086	1.086	1.086	1.087
C <sup>φ</sup> - H <sup>λ</sup>	1.085	1.085	1.085	1.085	1.085	1.085
Al - N <sup>α</sup> - C <sup>ξ</sup>	126.68	125.33	126.12	125.69	126.71	126.61
Al - O- O	.....	.....	111.83	109.14	.....	.....
Al - H- H	.....	.....	.....	.....	88.44	68.93
N <sup>α</sup> - C <sup>ξ</sup> - N <sup>β</sup>	126.96	127.55	127.40	127.62	126.94	126.90
C <sup>ξ</sup> - N <sup>β</sup> - C <sup>μ</sup>	122.72	122.50	122.32	122.34	122.68	122.23
C <sup>ξ</sup> - C <sup>δ</sup> - C <sup>φ</sup>	131.82	132.33	131.97	132.23	131.83	132.23
C <sup>δ</sup> - C <sup>φ</sup> - C <sup>η</sup>	117.29	117.53	117.24	117.47	117.28	117.79

Nota:

\* X - pode ser o átomo de oxigênio ou hidrogênio adsorvido no alumínio

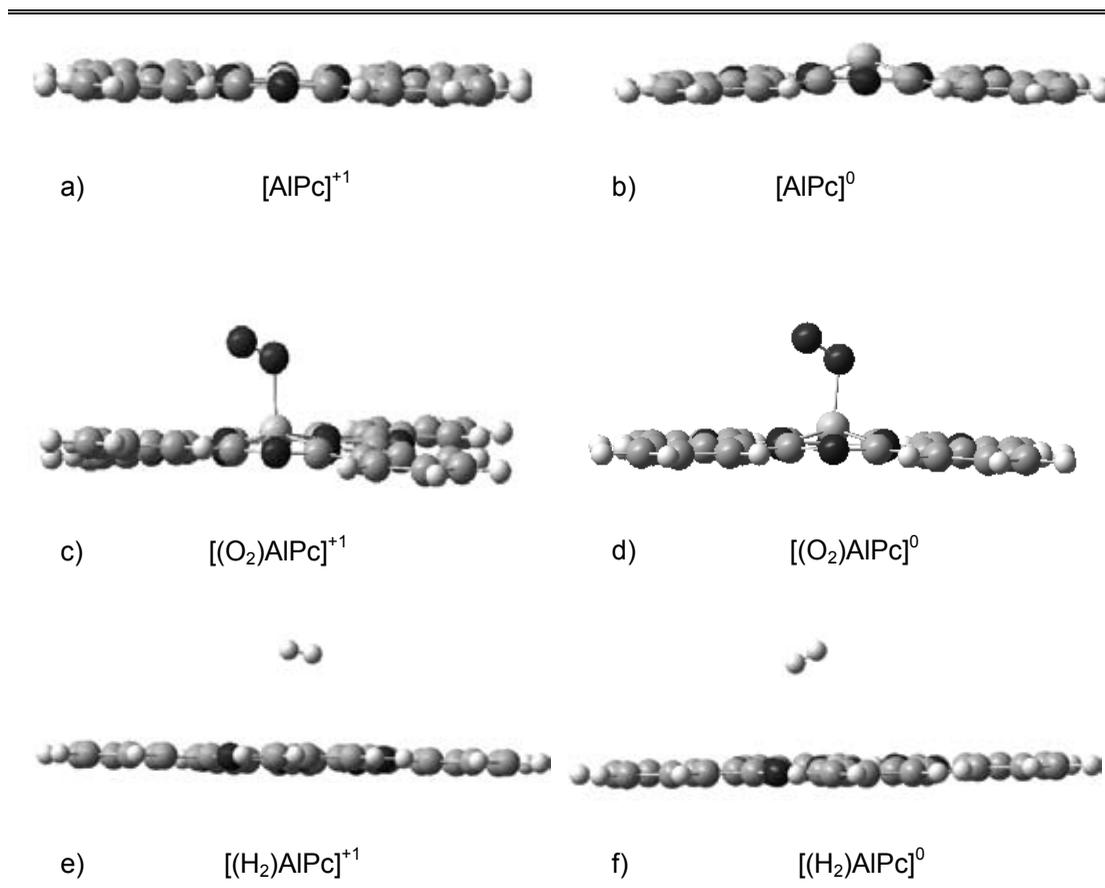
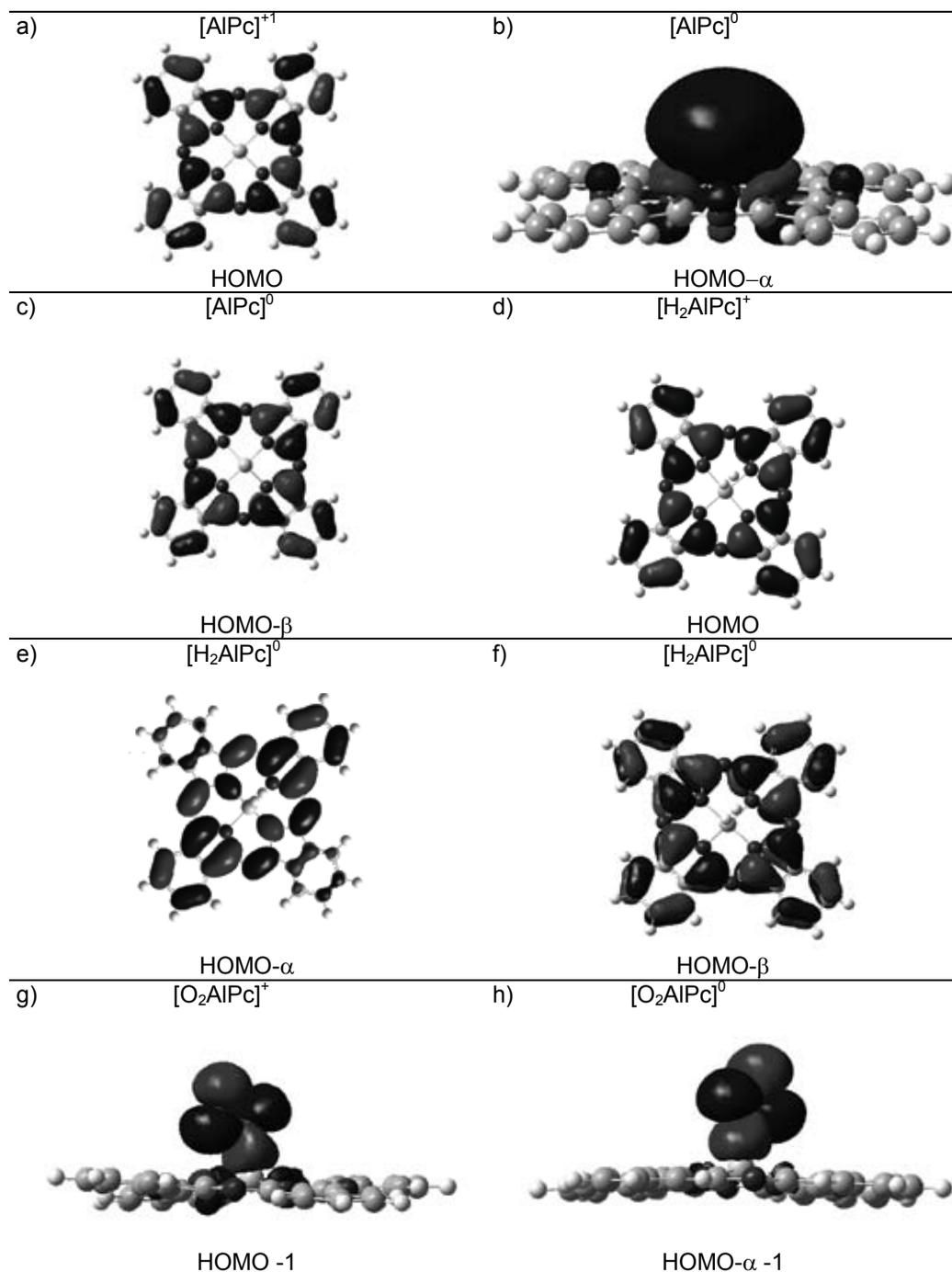


Figura 2: Geometrias dos complexos de AlPc otimizados a nível de teoria DFT/B3LYP/6-31G(d).

Como já citado, quando a ftalocianina de alumínio é reduzida, o átomo de alumínio projeta-se para fora do plano molecular. A análise dos orbitais moleculares de fronteira ajuda esclarecer esse comportamento. No estado oxidado, a AlPc é um complexo de camada fechada, isto é, apresenta todos os seus elétrons emparelhados, com multiplicidade um. Como pode ser visto na Figura 3, o HOMO do complexo  $[\text{AlPc}]^+$  é um orbital de caráter  $\pi$  ligante (Figura 3a), entretanto, esse orbital não tem nenhuma contribuição na região central da molécula onde se encontra o átomo de alumínio. Ao adicionar um elétron ao complexo, o sistema passa a ser de camada aberta, com multiplicidade dois. Nesse caso, os elétrons  $\alpha$  e  $\beta$  devem ser tratados separadamente. Calcula-se então, dois orbitais HOMO: HOMO- $\alpha$  e HOMO- $\beta$ . As Figuras 3b e 3c mostram os gráficos obtidos com DFT/B3LYP/6-31G(d) para o complexo  $[\text{AlPc}]^0$ . O orbital

HOMO- $\beta$  não contribui para a ligação do átomo de alumínio. Entretanto, o orbital HOMO- $\alpha$  está centrado na região de complexação do Al (ver Figura 3b). Esse orbital tem um forte caráter antiligante entre o átomo de Al e os átomos de nitrogênios coordenados. Assim, colocar um elétron nesse orbital significa diminuir a ordem de ligação e, conseqüentemente, diminuir a força da ligação entre o Al e os nitrogênios. Essa é a principal razão que leva a projeção do Al para fora do plano molecular no estado reduzido.

A análise dos parâmetros geométricos mostra que a ligação  $\text{H}_2\text{---Al}$  é relativamente fraca em ambos os estados de oxidação. Os gráficos dos orbitais de fronteira nos fornecem uma explicação razoável para esse fato. Tanto no estado oxidado (Figura 3d) quanto no reduzido (Figura 3e e 3f), não existe nenhuma contribuição para a ligação entre o  $\text{H}_2$  e o complexo AlPc.



**Figura 3:** Orbitais moleculares de fronteira obtidos para os vários complexos com o nível de teoria DFT/B3LYP/6-31G(d).

**COMPLEXOS [(O<sub>2</sub>)AlPc]<sup>0</sup> e [(O<sub>2</sub>)AlPc]<sup>+</sup>**

Os dados da Tabela 1 mostram que a diferença no comprimento da ligação Al---O<sub>2</sub> nos complexos [(O<sub>2</sub>)AlPc]<sup>+</sup> e [(O<sub>2</sub>)AlPc]<sup>0</sup> é de 0,061 Å, sendo que o comprimento é maior no estado oxidado do que no estado reduzido. Essa pequena diferença sugere que o estado de oxidação não interfere de forma significativa na interação do O<sub>2</sub> com o complexo AlPc. Observa-se também que a projeção do átomo de alumínio para fora do plano no complexo [(O<sub>2</sub>)AlPc]<sup>0</sup> é 0,129 Å menor do que o calculado no complexo [AlPc]<sup>0</sup>, o que indica que a presença do O<sub>2</sub> no estado reduzido ajuda a estabilizar o complexo. Os demais parâmetros não sofrem alterações significativas quando a AlPc complexa com o O<sub>2</sub>. Outro fato interessante é uma leve distorção na estrutura da ftalocianina no estado

oxidado quando complexado com O<sub>2</sub>, fato que não é observado no estado reduzido, como pode ser visto na Figura 2c e 2d.

As ordens de ligação (Tabela 2) calculadas entre o alumínio e oxigênio no complexo [(O<sub>2</sub>)AlPc] nos estados oxidado e reduzido são 0,34 e 0,39, respectivamente. Esses valores mostram que em ambos os estados de oxidação há a formação de uma ligação simples entre o átomo de oxigênio do O<sub>2</sub> e o átomo de alumínio do complexo AlPc. As ordens de ligação das ligações Al---N<sup>α</sup> são de 0,33 ([[(O<sub>2</sub>)AlPc]<sup>+</sup>] e 0,32 ([[(O<sub>2</sub>)AlPc]<sup>0</sup>), valores que sugerem uma forte polarização da ligação. As demais ordens de ligações entre os átomos no complexo de [(O<sub>2</sub>)AlPc] não sofrem alterações significativas com a mudança do estado de oxidação.

**Tabela 2:** Ordens de ligação derivadas da análise populacional natural (NPA – *Natural Population Analise*<sup>18</sup>) usando o nível de teoria B3LYP/6-31G(d)//NBO 3.1

	[AlPc] <sup>+1</sup>	[AlPc] <sup>0</sup>	[O <sub>2</sub> AlPc] <sup>+</sup>	[O <sub>2</sub> AlPc] <sup>0</sup>	[H <sub>2</sub> AlPc] <sup>+</sup>	[H <sub>2</sub> AlPc] <sup>0</sup>
H--Al	.....	.....	.....	.....	0.01	0.01
O--Al	.....	.....	0.34	0.39	.....	.....
Al--N <sup>α</sup>	0.40	0.29	0.33	0.32	0.39	0.39
N <sup>α</sup> - C <sup>ξ</sup>	1.14	1.20	1.15	1.19	1.14	1.15
C <sup>ξ</sup> - N <sup>β</sup>	1.39	1.37	1.41	1.38	1.39	1.28
C <sup>ξ</sup> - C <sup>φ</sup>	1.12	1.10	1.11	1.10	1.13	1.19
C <sup>φ</sup> - C <sup>η</sup>	1.33	1.35	1.35	1.35	1.33	1.29
C <sup>φ</sup> - C <sup>η</sup>	1.48	1.47	1.45	1.47	1.48	1.53
C <sup>η</sup> - H <sup>γ</sup>	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.92
C <sup>φ</sup> - H <sup>λ</sup>	0.90	0.91	0.90	0.91	0.90	0.91

**Tabela 3:** Cargas atômicas derivadas da análise populacional de Mülliken usando o nível de teoria DFT/B3LYP/6-31G(d).

	[AlPc] <sup>+1</sup>	[AlPc] <sup>0</sup>	[O <sub>2</sub> AlPc] <sup>+</sup>	[O <sub>2</sub> AlPc] <sup>0</sup>	[H <sub>2</sub> AlPc] <sup>+</sup>	[H <sub>2</sub> AlPc] <sup>0</sup>
H	.....	.....	.....	.....	0.02	0.00
H(lig)	.....	.....	.....	.....	0.01	0.01
O	.....	.....	-0.12	-0.19	.....	.....
O(lig)	.....	.....	-0.20	-0.29	.....	.....
Al	0.94	0.58	0.58	0.97	0.93	0.91
N <sup>α</sup>	-0.67	-0.66	-0.66	-0.65	-0.67	-0.67
C <sup>ξ</sup>	0.49	0.49	0.51	0.50	0.48	0.48
N <sup>β</sup>	-0.53	-0.56	-0.54	-0.55	-0.53	-0.53
C <sup>δ</sup>	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08	0.07
C <sup>φ</sup>	-0.17	-0.18	-0.16	-0.18	-0.17	-0.17
C <sup>η</sup>	-0.13	-0.13	-0.13	-0.13	-0.13	-0.13
H <sup>γ</sup>	0.17	0.14	0.17	0.14	0.17	0.17
H <sup>λ</sup>	0.17	0.15	0.17	0.16	0.17	0.17

A análise das cargas atômicas parciais sobre o complexo de  $[(O_2)AlPc]$  (Tabela 3) mostra que o alumínio apresenta uma carga em torno de +1 tanto no estado oxidado quanto no reduzido. Esse resultado está de acordo com a intuição química, pois o oxigênio é o segundo elemento mais eletronegativo. No estado reduzido parte da carga negativa é distribuída sobre os átomos da molécula de oxigênio e quando comparados com o estado oxidado têm seus valores de carga diminuídos de -0,12 para -0,19 (oxigênio não ligado ao alumínio) e -0,20 para -0,29 (oxigênio ligado ao átomo de alumínio).

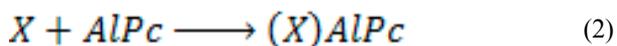
As figuras 3g e 3h mostram os orbitais moleculares de fronteira para os complexos de  $(O_2)AlPc$ . Estes orbitais apresentam um forte caráter ligante entre o átomo de oxigênio e o átomo de alumínio em ambos os estados de oxidação, o que explica a formação da ligação simples e fazendo com que a adsorção do  $O_2$  seja de natureza química.

## ANÁLISE ENERGÉTICA DA ADSORÇÃO DOS GASES $O_2$ e $H_2$ SOBRE A $AlPc$

A força de interação entre a ftalocianina de alumínio e os gases  $O_2$  e  $H_2$  pode ser quantificada, calculando a energia de ligação para a formação dos complexos de  $AlPc$  com os gases adsorvidos nos diferentes estados de oxidação. Os cálculos destas energias levam em consideração a correção da energia do ponto zero de vibração (ZPVE) e a correção das energias dos reagentes devido ao uso do conjunto de base não saturado (BSSE). As energias de ligação (interação) foram obtidas conforme

$$\Delta E = E_{(X)AlPc} - (E_{AlPc} + E_X) \quad (1)$$

onde,  $\Delta E$  representa a energia de interação,  $E$  é a energia calculada com a teoria do funcional de densidade e  $X=O_2$  e  $H_2$ . A reação geral de formação é,



A Tabela 4 mostra os resultados dos cálculos com DFT/B3LYP/6-31G(d) incluindo o efeito do ponto zero de vibração (ZPVE) e a correção da energia devido ao erro causado pela superposição de funções de base (BSSE).

Os cálculos das energias de interação mostram que a coordenação axial da molécula de  $O_2$  é energeticamente favorável, tanto no estado oxidado (-44,62Kcal/mol) quanto no estado reduzido (-108,71Kcal/mol). Essa forte interação energética indica uma adsorção química, sendo que a adsorção é muito mais favorável no estado reduzido.

Os valores energéticos obtidos nos cálculos para a complexação do  $H_2$  com a  $AlPc$  nos estados oxidados e reduzidos são, respectivamente, -0,25 kcal/mol e -0,64 kcal/mol (ver Tabela 4). Esses valores mostram que a adsorção do  $H_2$  não ocorre com a formação de ligação, i.e., é uma adsorção física. Essa interação é ligeiramente mais favorável no estado reduzido. Embora a força de interação seja fraca nos dois estados, ela é possível.

**Tabela 4:** Energias das reações de formação em Kcal/mol, levando em consideração a energia do ponto zero de vibração (ZPVE) e a energia dos reagentes incluindo o efeito dos orbitais ghost para o cálculo do erro devido ao uso do conjunto de base não saturado (BSSE), usando o nível de teoria B3LYP/6-31G(d).

Reação	$\Delta E$ (kcal/mol)
$AlPc^{+1} + O_2 \rightarrow [(O_2)AlPc]^{+1}$	-44.62
$AlPc^0 + O_2 \rightarrow [(O_2)AlPc]^0$	-108.71
$AlPc^{+1} + H_2 \rightarrow [(H_2)AlPc]^{+1}$	-0.25
$AlPc^0 + H_2 \rightarrow [(H_2)AlPc]^0$	-0.64

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Goiás pelo suporte à realização deste trabalho e a agência financiadora CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida há um dos autores (Valter H. C. Silva). Anselmo agradece à FUNAPE da Universidade Federal de Goiás.

## REFERÊNCIAS

- Leznoff, C.C.; Lever, A.B.P. *Phthalocyanines: Properties And Applications*. Vol 3. New York. **1989**
- Diesbach, H.E.; Weid, E. *Phthalocyanines: An X-Ray Study*. *Helv. Chim. Acta*, V.10, 886-896, **1927**.

3. Loutfy, R.O.; Mcintyre, L.F. *Can. J. Chem.*, V.61, 72-77, **1983**.
4. Robertson, J.M. *J. Chem. Soc.*, V.1, 615-621, **1935**.
5. Kantekin, H.; Rakap, M.; Gök, Y.; Sanhinbas, H.Z. *Dyes And Pigments*. 74, **2007**, 21-25.
6. Makarov, S.G.; Maksimova, K.N.; Baranov, E.V.; *Russian Chemical Bulletin*. 55, **2006**, 1748-1754.
7. Machado, A.E.H. *Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas*. Divulgação. Uberlândia. **1999**.
8. Zezell, D.M. *Hematoporfirinas e Derivados: Propriedades Ópticas e Terapia Fotodinâmica do Câncer. Dissertação de Mestrado*. Unicamp – Campinas. **1987**.
9. Dent, C.E.; Linstead, R.P.; Lowe, A.R.J. *J. Chem. Soc.*, V. 2, 1033-1039, **1934**.
10. Maitrot, M.; Guillaud, G.; Boudjema, B.; André, J.J.; Strzelecka, H.; Simon, J.; Even, R. *Chem. Phys. Lett*. V.133, 59, **1987**.
11. Zhu, D.G; Petty, M.C.; Harris, M. *Sensor Actuat. B-Chem.*, V.2, 265-269, **1990**.
12. Saji, T. *Phthalocyanines: Properties And Applications*. New York, VCH, **1993**. 59-60.
13. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johns, Gaussian 03, Revision B.04.
14. A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98, **1993**, 5648.
15. S. Simon, M. Duran, And J. J. Dannenberg, *J. Chem. Phys.* 105, 11024, **1996**.
16. S. F. Boys, F. Bernardi, *Mol. Phys.* 19, 553, **1970**.
17. R. S. Mulliken, *J Chem. Pjys.* 23, 1888, **1955**.
18. E.D. Glendening, J.K. Badenhoop, A.E. Reed, J.E. Carpenter, F. Weinhold, Nbo Version 3.1, *Theoretical Chemistry Institute*, University Of Wisconsin, Madison.

---

Valter H. C. Silva<sup>1\*</sup>, Ademir J. Camargo<sup>1</sup>, Hamilton B. Napolitano<sup>1</sup>, Anselmo E. de Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ciências Exatas e Tecnológicas, UEG, CP 459, CEP 75001-970, Anápolis, GO, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto de Química, UFG, CP 131, CEP 74001-970, Goiânia, GO, Brasil

\*E-mail: fatioleg@ueg.br

# Engenharia de Proteína como Estratégia para o Estudo da Estrutura e Função de Proteínas

Euripedes A. Ribeiro Jr

O objetivo deste trabalho foi promover mutações sítio - dirigidas na Mb para obter deleções específicas das regiões N- e C-terminais desta proteína. Nestas regiões se encontram as hélices que estão envolvidas na formação do intermediário. As deleções serão úteis para tentar responder questões quanto ao envolvimento das hélices AGH na formação, na cooperatividade do enovelamento e na estabilidade do intermediário e do estado nativo de Mb. Oito mutantes de deleção foram preparados e a estratégia para sua construção e produção são apresentados aqui.

**Palavras-chave:** *engenharia de proteínas; expressão de proteínas; purificação de proteínas; enovelamento de proteínas.*

The aim of this work was produce myoglobin (Mb) without N- and C-terminals fragments, which are described as important sequence to intermediate formation during its protein folding pathway. These truncated myoglobin will be useful to attempt to answer question about the role of these helices in the formation of intermediate in the myoglobin folding pathway, folding cooperativity and the stability of the intermediate and native state. For that, eight truncate clones were constructed and their results of expression and purification are present here.

**Key words:** *protein engineer; protein expression; protein purification; protein folding.*

## Introdução

A biossíntese de uma proteína nos ribossomos é somente uma das etapas para a formação de uma proteína funcional. Outra etapa importante é o enovelamento correto do polipeptídeo linear formando sua estrutura tridimensional<sup>1,2</sup>. No entanto, o conhecimento básico do mecanismo molecular responsável pelo enovelamento de proteínas ainda permanece como um dos maiores desafios para a biologia estrutural. Várias questões quanto aos mecanismos e a presença de intermediários na via de enovelamento são objetos de diversos estudos<sup>1,2,3</sup>.

Se o enovelamento de proteínas fosse um processo randômico, uma proteína necessitaria de um tempo infinitamente longo para testar todas as conformações possíveis. Este tempo aumentaria exponencialmente com o aumento da cadeia de aminoácidos, o que é improvável dado a rapidez com que o enovelamento ocorre<sup>4</sup>. Estas considerações levam a crer que existam mecanismos específicos para a formação de estruturas protéicas estáveis e funcionais. Anfinsen<sup>1,2,3,4</sup> estudando o desenovelamento da ribonuclease A, demonstrou que a estrutura terciária de uma proteína está relacionada à sua seqüência de aminoácidos. Ptitsyn<sup>2</sup> sugeriu um mecanismo que ocorreria em três etapas: 1) formação muito rápida de uma estrutura secundária; 2) colapso desta estrutura em uma forma compacta e sem conformação terciária rígida; e 3) formação de estrutura nativa compacta. No entanto, a compreensão desse processo requer um melhor conhecimento das vias envolvidas pois, em muitos casos, a estrutura nativa de uma proteína pode ser determinada mais pela via de enovelamento do que pela conformação mais estável.

As estruturas intermediárias são freqüentemente observadas durante o estudo da cinética de enovelamento de pequenas proteínas<sup>4,5,6,7,8,9</sup>. No entanto, o problema prático para se estudar intermediários presentes nesta via é que as reações de enovelamento para essas proteínas são altamente cooperativas, sendo que os intermediários formados só existem nesta forma por um curto período de tempo. Contudo, as  $\alpha$ -lactalbuminas, as lisozimas e as apomioglobinas são alguns exemplos de proteínas que apresentam intermediários em equilíbrio<sup>7,8,9,10,11,12</sup>. Os estudos desses intermediários tem ajudado a

responder questões relacionadas à rapidez e à eficiência de enovelamento de proteínas.

A mioglobina (Mb) de espermacete (Physeter catodon) é uma proteína globular de massa molecular de 17 kDa (153 aminoácidos), monomérica e que possui 8  $\alpha$ -hélices que são nomeadas de A à H<sup>3</sup> (Figura 1). A sua forma apo (apoMb) é considerada um ótimo modelo para o estudo de intermediários da via de enovelamento de proteína<sup>1,12,13</sup>. Durante o desenovelamento induzido pela diminuição do pH, a apoMb forma um intermediário à pH em torno de 4.2 com propriedades físicas tanto do estado enovelado (pH neutro) quanto do desenovelado (pH 2)<sup>11</sup>. Outros grupos de pesquisa sugerem a presença de dois intermediários na via de enovelamento desta proteína<sup>2,7,8,9</sup>. O primeiro intermediário é associado com um subdomínio formado pelas hélices A, G e H (Fig. 1), enquanto as demais permanecem desordenadas<sup>1</sup>. O segundo, seria formado pela incorporação da hélice B às demais hélices do primeiro intermediário<sup>2</sup>. Estas observações sugerem um enovelamento seqüencial com subsequente incorporação das hélices que ainda estão desordenadas resultando na formação de uma proteína com estrutura compacta e estável<sup>2</sup>.

O objetivo deste trabalho foi promover mutações sítio - dirigidas na Mb para obter deleções específicas das regiões N- e C-terminais desta proteína. Nestas regiões se encontram as hélices que estão envolvidas na formação do intermediário. As deleções serão úteis para tentar responder questões quanto ao envolvimento das hélices AGH na formação, na cooperatividade do enovelamento e na estabilidade do intermediário e do estado nativo de Mb. Oito mutantes de deleção foram preparados e a estratégia para sua construção e produção são apresentados aqui. Contudo, apenas as proteínas selvagem e mutantes de deleção da extremidade C-terminais (MbHdel e MbGHdel) foram expressas e purificadas.

## Materiais e Métodos

### BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

cDNA de Mbwt está clonado em pT7-7 (pT7-7Mbwt), plasmídeo para sistema de expressão sob o controle da enzima T7 RNA polimerase. Este plasmídeo possui o gene de resistência ao antibiótico carbenicilina

(gene bla). Na figura 2, está mostrado o vetor pT7-7 que foi utilizado como fita molde para construção dos mutantes de Mb. Linhagens de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi utilizada para multiplicação e manutenção de vetores plasmidiais, enquanto BL21(DE3), que possui níveis baixos de produção de proteases e minimiza problemas de degradação de proteína e possui o gene (DE3) responsável pela síntese da enzima T7 RNA polimerase, controlado pelo promotor lacUV5 e ativado pela adição de IPTG foi utilizada para expressão. As bactérias competentes, necessárias para a transformação com os plasmídeos alvos, foram obtidas pelo seguinte processo: uma colônia isolada de bactéria foi multiplicada em 5 mL de meio de cultura TYM líquido à 37°C sob agitação constante de 150 ciclos/min por 16 horas. Essa cultura foi diluída, na proporção de 1:100, em 10 mL de TYM e mantida sob agitação de 200 ciclos/min à 37°C até que a densidade ótica a 600 nm (O.D600), atingisse a faixa entre 0,2 e 0,6. Estes 10 mL foram homogeneizados em 40 mL de TYM e mantidos nas condições de crescimento descritas anteriormente até que a O.D600 atingisse a faixa entre 0,5 e 0,9. Estes 50 mL foram dispensados em 200 mL de TYM e a O.D600 monitorada até 0,6. Nesta última etapa de crescimento, a cultura de bactérias foi rapidamente resfriada para 4°C, em banho de gelo, e centrifugada à 2.590xg por 15 min à 4°C (centrífuga refrigerada).



**Figura 1:** Esquema da estrutura terciária de Mb destacando as hélices envolvidas na formação dos intermediários de enovelamento. As hélices A, [B], G e H que formariam os intermediários<sup>1,2</sup> estão evidenciadas pelas cores vermelha, amarela, ciano e verde, respectivamente. As demais hélices (C à F) e que estariam desestruturadas nos intermediários estão marcadas pela cor azul.

O sobrenadante foi descartado e as bactérias foram ressuspendidas, gentilmente, em 100 mL de TBF1 gelado (Acetato de potássio 30 mM, MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O 50 mM, KCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 10 mM e 15 % (m/v) de glicerol – solução esterilizada por filtração). Esta suspensão foi centrifugada à 2.590xg durante 8 min e o precipitado formado foi ressuspendido em 10 mL de TFB2 (tampão MOPS 10 mM pH 7,0, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 75 mM e 15 % (m/v) de glicerol). Estas bactérias, denominadas competentes, foram dispensadas em alíquotas de 100 L e armazenadas à – 80°C. Os meios de cultura utilizados foram TYM: triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5,8 g/L e MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2,5 g/L e LB (Luria-Bertani): tryptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L. Para o meio sólido acrescenta-se 1,5% de ágar.

Para a transformação das bactérias, 100  $\mu$ L de bactérias competentes foram descongelados em gelo e homogeneizados em 80  $\mu$ L de tampão de transformação [KCl 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 50 mM e MgCl<sub>2</sub> 50 mM e PEG 6000 1,5% (m/v)] e 20  $\mu$ L do plasmídeo de interesse com concentração final entre 0,5 ng/ $\mu$ L e 2,5 ng/ $\mu$ L. Este homogeneizado foi incubado em gelo durante 30 min, seguido de um choque térmico à temperatura ambiente por 10 min. Após esta etapa, 1 mL de meio de cultura LB foi adicionado e incubado à 37°C por 50 min, cuidando para que as bactérias fossem suavemente ressuspendidas a cada 15 min de incubação. Após este tratamento, as bactérias foram centrifugadas à 2.590xg durante 1 min para a remoção de 1 mL de meio de cultura e o volume residual deste meio foi utilizado para ressuspende as bactérias sedimentadas. Nesta etapa, 100  $\mu$ L da suspensão foram espalhados em placas, com o auxílio de alça de “Drigausky”, contendo meio de cultura sólido (LB) com o(s) antibiótico(s) apropriado(s) para a seleção e crescimento, à 37°C por 16 horas, dos clones transformados. Nas placas citadas anteriormente, para as transformações de DH5 $\alpha$  e BL21(DE3), foram adicionados 50  $\mu$ g/mL de carbenicilina.

A extração de DNA plasmidial foi realizada através do método de lise alcalina em pequena escala<sup>3</sup>. Uma colônia isolada de bactéria *E. coli* da linhagem DH5 $\alpha$ , transformada com plasmídeo de interesse, foi inoculada em 2,0 mL de meio de cultura LB contendo 50  $\mu$ g/mL de carbenicilina e mantida sob agitação constante de 200 ciclos/min por 16 horas. Esta cultura de bactéria foi

centrifugada à 12.000xg durante 1 min, à temperatura ambiente, em microcentrífuga. O sobrenadante foi removido por aspiração utilizando-se uma bomba de vácuo. Em seguida, este sedimento foi ressuscitado, com auxílio de vortex, em 100 µL de tampão tris-HCl 25 mM pH 8,0 contendo glicose 50 mM e EDTA 10 mM pH 8,0. Após a completa homogeneização, 200 µL da solução de lise, contendo NaOH 200 mM e 1% de SDS, foram adicionados para o rompimento das bactérias. Esta solução foi homogeneizada, através de cinco inversões suaves, e mantida no gelo. Rapidamente, mais 150 µL de uma solução de acetato de potássio 3 M e ácido acético glacial 5 M foi adicionada. A solução foi homogeneizada por 10 inversões suaves e mantida no gelo por um período de 3 a 5 minutos. O homogeneizado foi centrifugado à 12.000xg durante 5 minutos à temperatura ambiente em microcentrífuga. O sobrenadante foi removido cuidadosamente para não ocorrer contaminação com DNA genômico e transferido para um tubo limpo. O mesmo volume de fenol:clorofórmio (1:1 v/v) foi adicionado, homogeneizado com o auxílio de vortex e centrifugado nas condições descritas anteriormente. O sobrenadante, contendo DNA plasmidial, foi transferido para um tubo limpo e em seguida precipitado com etanol absoluto à temperatura ambiente. Esta reação foi agitada com vortex e mantida na mesma temperatura por 2 min para em seguida ser centrifugada a 12.000xg durante 5 min em microcentrífuga. O sobrenadante foi removido por aspiração e uma alíquota de 1 mL de etanol 70% gelado foi adicionado. Estas amostras foram centrifugadas conforme descrito anteriormente e o sobrenadante foi novamente removido por aspiração. Os tubos, contendo DNA plasmidial precipitado, foram mantidos abertos à temperatura ambiente, por 10 min para a eliminação de etanol residual. Após esta etapa, o DNA plasmidial foi ressuscitado em 20 µL de TE (tris-HCl 10 mM pH 8.0 e EDTA 1 mM pH 8.0) contendo RNase 20 µg/mL.

Para a obtenção de DNA plasmidial com um grau de pureza maior, principalmente para as reações de PCR e sequenciamento de DNA, utilizou-se o mesmo método de lise alcalina, porém com auxílio de kit de extração de DNA plasmidial, QIAprep (QIAGEN). A determinação da concentração de DNA foi feita através da comparação de intensidade de marcação com brometo de etídio (EtBr) destas amostras de DNA, em relação à marcação com

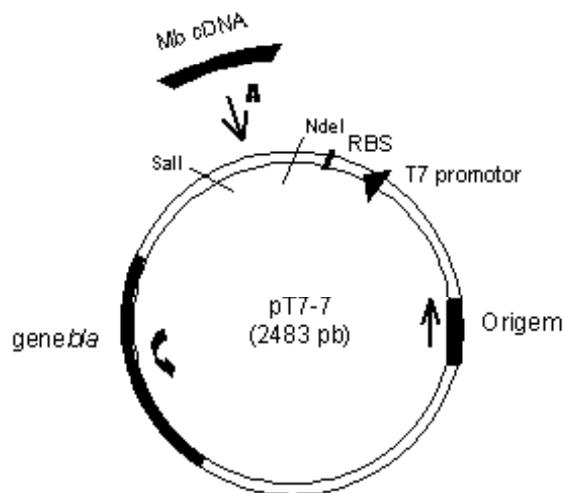
EtBr de um padrão de bandas de DNA ( $\lambda$ DNA/HindIII, GIBCO). Estas marcações foram visualizada em gel de agarose corado com EtBr.

Estratégias de mutação: As mutações propostas consistem em remover hélices das extremidades N- e C- terminais da Mb que estão envolvidas na formação do intermediário. Para tanto foram desenhados oligonucleotídeos contendo mutações (Tabela 1) que permitem as alterações das posições dos códons de iniciação e/ou de parada de transcrição do cDNA que codifica a Mb selvagem (Mbwt) [Figuras 3 e 4]. Juntamente com estas mutações foram criados sítios de restrição para a seleção dos prováveis mutantes antes do sequenciamento. As mutações foram produzidas através de mutagênese sítio - dirigida usando a tecnologia de reação de polimerase em cadeia (PCR) descrita por Landt et al. (1990)<sup>4</sup> com algumas modificações. Para estes PCR's foram utilizados 200 nM de cada oligonucleotídeo, contendo ou não a(s) mutação(es) desejada(s) [Tabela 1], que hibridizam nas seqüências complementares de cada extremidade 3' da fita molde de DNA (pT7-7Mbwt), foram homogeneizados em uma solução de Tris-HCl 22 mM pH 8.4, KCl 55 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,65 mM, dATP 220 µM, dGTP 220 µM, dCTP 220 µM, dTTP 220 µM, Taq DNA polimerase recombinante 22 U/mL (PCR SUPERMIX, GIBCO). A reação de polimerase em cadeia foi feita com 1 ciclo inicial de desanelamento à 95°C (5 min), 35 ciclos de amplificação [95°C (1 min), 54°C (1 min) e 72°C (2 min)] e 1 ciclo final de extensão à 72°C por 5 min em termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf). O produto desta amplificação foi resolvido em gel de agarose, corado com brometo de etídio, e a banda de tamanho esperado foi extraída pelo método de purificação de DNA em gel de agarose utilizando o kit QIAEX II (QIAGEN). Este produto extraído (inserto) e o vetor de clonagem, pT7-7Mbwt, extraído pelo método de lise alcalina, foram digeridos com enzimas de restrição, homogeneizados na proporção de pelo menos 1:3 (vetor : inserto) e submetidos a uma reação de ligação na presença de T4 DNA ligase (GIBCO) à 16°C por 16 horas. Esta reação de ligação foi utilizada para transformação de bactérias competentes. As colônias transformadas foram selecionadas em meio LB contendo o(s) antibiótico(s) apropriado(s) e preparadas para a extração dos plasmídeos

através de lise alcalina. Estes plasmídeos foram utilizados para os testes de detecção de provável mutante. A reação de PCR, para sequenciamento dos mutantes, foi feita utilizando-se o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer) e foi conduzida em termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf). O sequenciamento foi feito em sequenciador automático 377 Abi prism (Perkin Elmer).

## EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

Bactérias *E. coli* da linhagem BL21(DE3) contendo plasmídeo vector (Fig. 2) foram crescidas em meio de cultura LB, contendo 50 µg/mL de carbenicilina, sob agitação constante de 200 ciclos/min à 37°C (incubadora refrigerada com agitação, TECNAL TE-421). Este crescimento foi monitorado até que a O.D600 atingisse 0,8. Atendida esta fase de crescimento, as culturas foram induzidas à expressão com a adição de IPTG (Isopropiltiol-β-D-galactosídeo) na concentração final de 0,4 mM. Imediatamente a temperatura de crescimento foi modificada para 42°C e nesta condição as culturas foram mantidas sob agitação (200 ciclos/min) por 5 h. As proteínas sintetizadas, nestas condições são estocadas em corpos de inclusão<sup>12</sup>. As culturas foram centrifugadas à 2.590xg por 10 min e a 4°C (centrífuga refrigerada, Sigma 4K15, rotor 12256), e o sedimento foi armazenado à -80°C.



**Figura 2:** Plasmídeo pT7-7 (2.483 pb) utilizado para clonagem e expressão. A seta marcada com a letra A mostra a região, entre os sítios de restrição para *NdeI* e *Sall*, onde o cDNA de Mb está clonado. RBS, sítio de ligação do ribossomo. Gene *bla*, gene para síntese da β-lactamase (resistência à carbenicilina). T7 promotor, região de ligação da enzima T7 RNA polimerase. Origem, região de origem de replicação. As setas dentro do plasmídeo indicam o sentido da transcrição.

**Tabela 1:** Oligonucleotídeos para construção dos mutantes de deleção.

oligos	Oligonucleotídeos desenhados <sup>1</sup>	Molde PCR	Proteína recombinante
E18Nde	5'-gtttgggctaaacat <b>atg</b> gctgacgtcgct-3' (a)	pT7-7Mbwt	19-153aa (14.9 kDa)
G124*	5'-accctgagc <b>gtcga</b> ctcagaagtcacctgg-3' (b)	pT7-7Mbwt	1-123aa (13.5 kDa)
P100*	5'-tcgcatgctactaaacataagatt <b>taa</b> tcaaatacctg-3' (c)	pT7-7Mbwt	1-99aa (10.9 kDa)
S35NdeI	5'-ttgattgactg <b>catatg</b> tctcatccggaa-3' (a)	pT7-7Mbwt	36-154aa (13.0 kDa)

Nota:

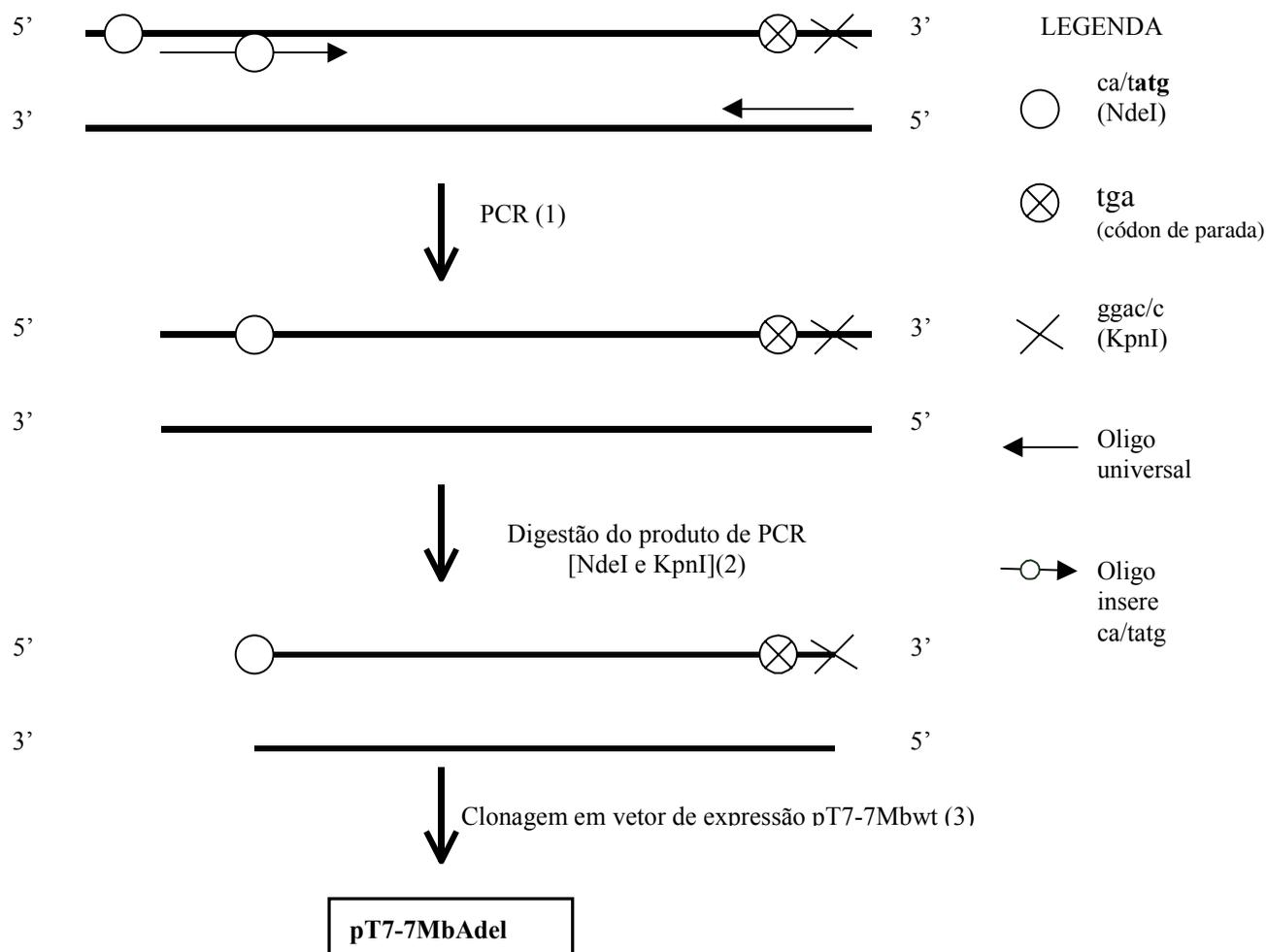
<sup>1</sup>As sequências em negrito estão representando os códons de iniciação (atg) e de parada de transcrição (tga ou taa) que serão inseridas em diferentes posições no cDNA da Mb, enquanto que as sequências sublinhadas representam os sítios de restrições criados.

(a) Oligonucleotídeos E18NdeI e S35NdeI para as deleções das hélices A e AB, respectivamente, inserem o códon de iniciação e o sítio de restrição NdeI (catatg) nas posições correspondentes aos aminoácidos E18 e S35 de Mbwt, respectivamente.

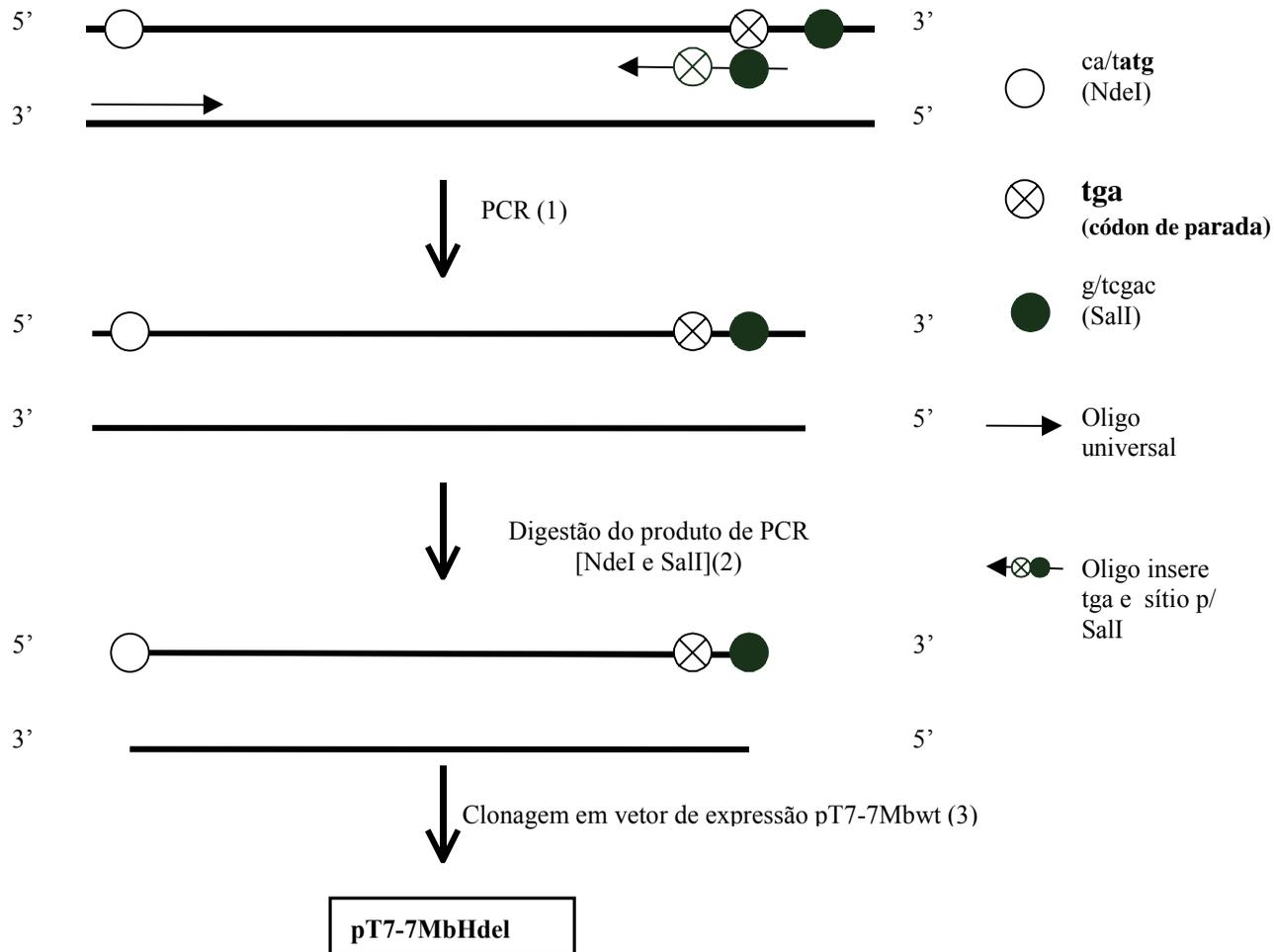
(b) Oligonucleotídeo para deleção da hélice H insere um códon de parada de transcrição (act – códon complementar à tga) no lugar de G124 e um sítio de restrição para Sall (gtcgac) para confirmação da mutação.

(c) Oligonucleotídeo para deleção das hélices GH insere um códon de parada de transcrição (taa) no lugar de P100 e um sítio para enzima de restrição DraI (tttaa) para confirmação da mutação.

As mutações para remoção das hélices AH, ABH, ABGH serão realizadas através da combinação das estratégias acima descritas.



**Figura 3:** Estratégia para construção do mutante de deleção da hélice A. (1) Reação de polimerase em cadeia (PCR) usando o cDNA de Mbwt, clonado em pT7-7, como fita molde. Os oligonucleotídeos utilizados são o C-terminal universal (sem mutação) e o N-terminal (mutante) que possui a seqüência *catatg* (sítio de restrição para *NdeI* e códon de iniciação de transcrição). O códon de iniciação substitui o códon para E18. (2) Digestão do produto de PCR com as enzimas de restrição *NdeI* e *KpnI* para obtenção do inserto referente ao cDNA de Mb sem a região que codifica para hélice A. (3) Clonagem do inserto em vetor de expressão pT7-7Mbwt. Esta mesma estratégia foi utilizada para a deleção das hélices AB modificando-se apenas o oligonucleotídeo N-terminal (Tabela 1) usado para o PCR (1).



**Figura 4:** Estratégia para construção do mutante de deleção da hélice H. (1) Reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando-se o cDNA de Mbwt, clonado em pT7-7, como fita molde. Os oligonucleotídeos utilizados são o N-terminal universal (sem mutação) e o C-terminal (mutante), que possui a seqüência para a mudança do códon de parada de transcrição no cDNA de Mbwt para G124. Este oligo também cria sítio para a enzima de restrição *SalI*. (2) Digestão do produto de PCR com as enzimas de restrições *NdeI* e *SalI*. (3) Clonagem do inserto no vetor de expressão pT7-7Mbwt.

### PURIFICAÇÃO DE MBS RECOMBINANTES:

As bactérias que expressaram as Mbs wt, Hdel e GHdel foram lisadas com auxílio de prensa de French® em tampão de lise contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 50 mM e EDTA 10 mM (15 mL/L de cultura) e centrifugadas à 17.700xg, por 30 min, à 4°C (centrífuga, SIGMA 4K15, rotor 12172-H). Os corpos de inclusão foram sedimentados e posteriormente lavados (3 vezes) em tampão de lise. A cada lavagem o material foi ressuspenso e centrifugado à 17.700xg por 30 min e à 4°C. A verificação da presença destes corpos de inclusão, contendo a proteína de interesse, foi feita por SDS-PAGE<sup>5</sup>.

Os corpos de inclusão foram solubilizados em 30 mL de tampão de solubilização (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 50 mM, Guanidina-HCl 6 M e Triton-X-100 0,5%) por litro de cultura de bactérias à 50°C por 90 min. O solubilizado foi diluído em um volume de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e dialisado à 4°C durante à noite em 5 L de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Após esta diálise, a amostra foi centrifugada à 21.240xg por 15 min e à 4°C (centrífuga SIGMA) para a remoção da parte insolúvel. A Mbwt e a MbHdel foram dialisadas em tampão tris - acetato 20 mM pH 6,0 e a MbGHdel neste mesmo tampão, porém à pH 6,5. Uma nova centrifugação foi realizada à 21.240xg por 15 min e à 4°C para remoção da parte insolúvel. O sobrenadante deste centrifugado foi submetido a passagem em coluna de troca iônica, DEAE-Sefarose (Fast Flow, Pharmacia - Biotech) equilibrada com 800 mL de tampão de equilíbrio, tampão tris - acetato 20 mM pH 6,0 (Mbwt e MbHdel) ou pH 6,5 (MbGHdel), à temperatura ambiente. A vazão da coluna foi controlada por gravidade e mantida em aproximadamente 6 mL/min. A proteína foi monitorada através de detector de U.V. (LC Detection Model 111, Gilson) por O.D. 280. A proteína de interesse foi coletada no eluato e sua pureza foi avaliada por SDS-PAGE. As amostras coletadas em cada passo do processo de purificação foram diluídas em tampão de amostra para eletroforese (tris-HCl 50 mM pH 6,8; DTT 100 mM; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1% e glicerol 10%), fervidas durante 5 min e centrifugadas por 2 min em microcentrífuga Eppendorf à temperatura ambiente. Estas amostras foram submetidas juntamente com um padrão de massa molecular (Marcador de proteínas pré - corado, New England, BioLabs) à eletroforese em SDS-

PAGE<sup>5</sup>. A eletroforese foi conduzida com a utilização do aparato Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad), com gel de empilhamento 5%, gel de separação 15% e voltagem constante de 200 V por 45 min. O gel foi corado por 30 min em etanol:ácido acético:água 5:1:15 (v/v/v) e Coomassie Brilliant Blue R (Bio-Rad) 0,25% e descorado em ácido acético:etanol:água 3:2:35 (v/v/v).

A concentração de proteínas foi determinada espectroscopicamente<sup>6</sup> utilizando os seguintes comprimentos de onda: 282, 280, 279, 278, 276 nm. A concentração de grupo heme foi determinada espectrometricamente utilizando  $\epsilon_{408} = 157 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . As amostras foram diluídas em tampão (pH 6,5) contendo fosfato de sódio na concentração final de 2 mM e guanidina-HCl 6 M. As concentrações de proteína foram determinadas utilizando os coeficientes de absorvância molar, apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Coeficientes de absorvância molar.

$\lambda$	$\epsilon$ Mbwt (mM <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon$ MbHdel (mM <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon$ MbGHdel (mM <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
282	14,80	12,40	11,20
280	15,22	12,66	11,38
279	15,35	12,66	11,32
278	15,40	12,60	11,20
276	15,15	12,25	10,80

Nota:

Estes coeficientes foram calculados utilizando a seguinte fórmula:

$$\epsilon(\lambda)(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) = n_{\text{Trp}} \times \epsilon_{\text{Trp}} + n_{\text{Tyr}} \times \epsilon_{\text{Tyr}} + n_{\text{Cys}} \times \epsilon_{\text{Cys}}$$

onde,  $\epsilon(\lambda)$ <sup>6</sup> é o coeficiente de absorvância molar (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) da proteína de interesse em um determinado comprimento de onda ( $\lambda$ );  $n_{\text{Trp}}$  - número de triptofanos da proteína;  $n_{\text{Tyr}}$  - número de tirosinas e  $n_{\text{Cys}}$  é o número de cisteínas.  $\epsilon_{\text{Trp}}$ ,  $\epsilon_{\text{Tyr}}$  e  $\epsilon_{\text{Cys}}$  são os coeficientes de absorvância molar do triptofano, da tirosina e da cisteína, respectivamente. Os valores dos coeficientes de absorvância molar destes aminoácidos variam com o comprimento de onda ( $\lambda$ ) (Schmid e Pace, 1997).

Os valores de  $\epsilon(\lambda)$  determinados anteriormente foram utilizados na seguinte fórmula:  $A = \lambda.l.C$  (equação de Beer - Lambert), onde A é a absorvância; l, comprimento do caminho ótico em cm e C, concentração molar em M<sup>-1</sup>. A concentração molar determinada corresponde à média das concentrações encontradas para cada comprimentos

de onda entre 276 e 282 nm. As leituras de absorvância, para cada comprimento de onda relacionado, foram realizadas em triplicada.

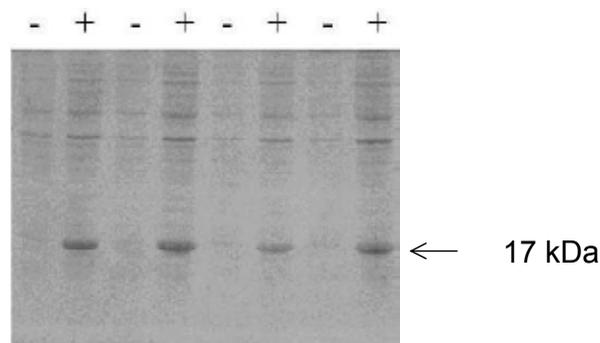
## Resultados

### EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO PROTEÍNA SELVAGEM:

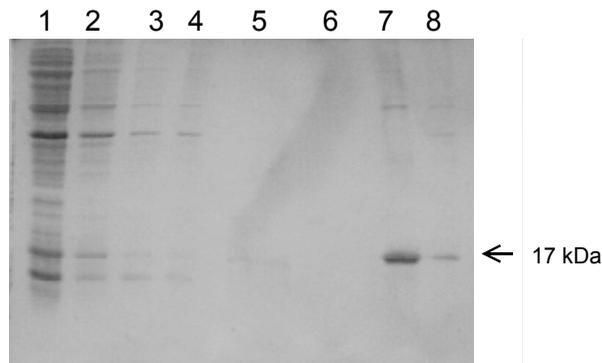
A Mbwt (~17 kDa) foi expressa em BL21(DE3) [Figura 5] e os corpos de inclusão produzidos durante esta expressão foram utilizados para purificação desta proteína.

O extrato bruto das bactérias induzidas à expressão, centrifugado à 17.700xg por 30 min, apresentou a formação de um precipitado de coloração bege. Este precipitado, após solubilização com tampão de solubilização de corpos de inclusão, apresentou uma banda com migração em gel de SDS-PAGE (15%) correspondente à 17 kDa. A Mbwt se manteve solúvel após a diálise em tampão tris-HCl 50 mM (pH 7,4). Esta diálise reduziu a quantidade de impurezas (Figura 6, linha 7). As diálises à pH 6,0 e à 6,5 resultaram numa redução ainda maior destas impurezas (Figura 7).

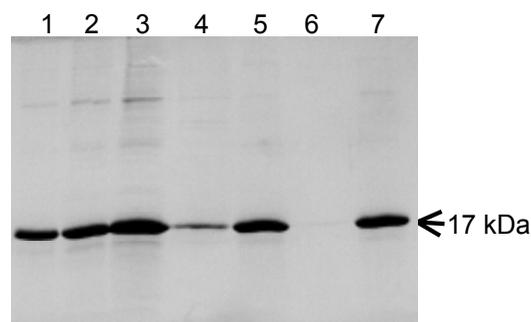
A concentração molar determinada para esta proteína foi de 130  $\mu$ M. O rendimento desta purificação foi de 132 mg/L de cultura de bactérias. O cálculo da concentração do grupo heme mostrou que a proteína purificada está >99% na forma apo.



**Figura 5:** Indução de Mbwt em larga escala. A indução de proteínas foi conduzida à 42°C por 5 horas em BL21(DE3). Os sinais positivos (+) e negativos (-) representam a presença e a ausência de IPTG 0,4 mM, respectivamente. A seta indica a proteína expressa com massa molecular de ~17 kDa. Estão representados quatro repetições independentes do experimento de indução de expressão. A expressão de Mbwt é induzida por IPTG.



**Figura 6:** SDS-PAGE das etapas de purificação de apoMbwt a partir de corpos de inclusão. A obtenção e a confirmação da presença de corpos de inclusão estão descritas nos itens 2.9 e 2.10 (Material e Métodos). Linha 1, amostra do extrato solúvel de bactérias BL21 (DE3). Linhas 2 - 4, amostras dos sobrenadantes das lavagens, sucessivas, dos corpos de inclusão. Linha 5, amostra dos corpos de inclusão lisados com tris-HCl pH 7,4 contendo guanidina-HCl 6M e triton X-100 0,05%. Linha 6, amostra do passo anterior diluída 2 vezes com tampão tris - HCl 50 mM pH 7,4. Linha 7, amostra do sobrenadante (após centrifugação da amostra da linha 6) após a diálise em tampão tris - HCl 50 mM pH 7,4. Linha 8, amostra do precipitado da diálise do passo anterior. A seta indica a Mbwt com aproximadamente 17 kDa.

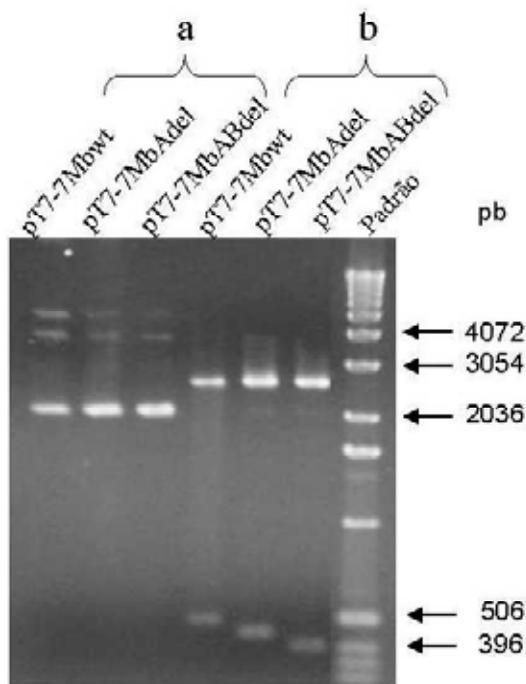


**Figura 7:** Efeito da mudança de pH na redução das impurezas durante a purificação de Mbwt. O volume total da amostra, que estava diluída em tampão pH 7,4, foi dividido ao meio e cada parte foi dialisada utilizando em tampão com diferentes pHs. Linha 1 - 3, Volumes crescentes de Mbwt em pH 7,4; linhas 4 e 5, amostras do precipitado e do sobrenadante após diálise de 7,4 para pH 6,0, respectivamente; linhas 6 e 7, amostras do precipitado e do sobrenadante formados após diálise de pH 7,4 para pH 6,5, respectivamente. A diálise modificando o pH de 7,4 para 6,5 ou 6,0 reduziu a quantidade de contaminantes durante a purificação.

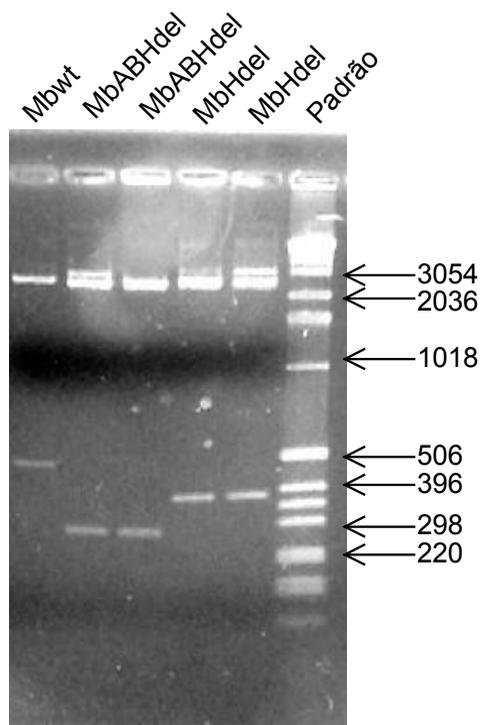
**ESTRATÉGIA DE VERIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO:**

A verificação da deleção foi feita através da comparação do tamanho do cDNA mutante em relação ao tamanho do cDNA de Mbwt que foi analisado em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio (Fig. 8). O padrão de digestão com *NdeI* e *KpnI* [Fig. 8 (b)] mostra a liberação de fragmentos de tamanho ~500 pb para pT7-7Mbwt, ~400 pb para pT7-7MbAdel e ~380 pb para pT7-7MbABdel.

A deleção da hélice H foi verificada pela comparação do tamanho do cDNA de Mbwt em relação ao tamanho do cDNA de MbHdel. A figura 9 mostra que a dupla digestão com *NdeI* e *Sall* resultou na liberação de fragmentos de ~500 pb, referente ao cDNA de Mbwt, e de ~400 pb, referente ao cDNA de MbHdel.

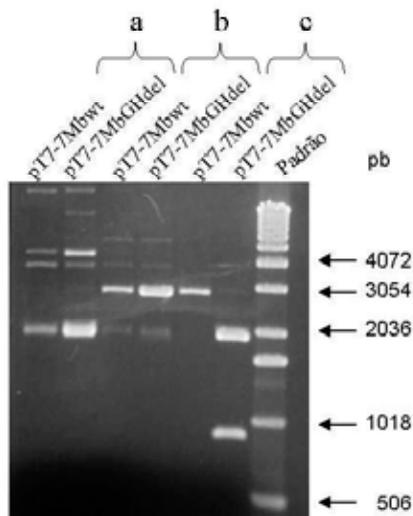


**Figura 8:** Análise dos mutantes de deleção das hélices A e AB. O gel de agarose (1,2%) mostra os perfis de bandas das amostras pT7-7Mbwt, pT7-7MbAdel e pT7-7MbABdel. (a) Amostras antes da digestão com enzimas de restrição. (b) Amostras após a digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *KpnI*. Padrão, amostra do padrão de pares de base (pb). A comparação do tamanho dos fragmentos liberados (menores que 506 pb) após a digestão mostra a possível remoção das regiões que codificam as hélices A e AB: para Mbwt fragmento de ~500 pb, para MbAdel ~400 pb e para MbABdel de ~380 pb.



**Figura 9:** Análise dos mutantes de deleção das hélices H e ABH. Perfis de bandas de pT7-7Mbwt, pT7-7MbABHdel (em duplicata) e de pT7-7MbHdel (em duplicata) após dupla digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *Sall*. Os sítios de restrição *NdeI* e *Sall* estão localizados na região de clonagem do vetor pT7-7Mbwt. A comparação do tamanho do fragmento de ~500 pb do cDNA de Mbwt em relação aos tamanhos dos fragmentos de ~300 pb do cDNA de MbABHdel e do cDNA de MbHdel de ~400 pb mostra a possível remoção das regiões que codificam as hélices ABH e H. Os marcadores de pares de base (pb) estão indicados pelas setas.

A Figura 10 mostra a confirmação da mutação de deleção das hélices GH. A digestão dos plasmídeos pT7-7MbGHdel e pT7-7Mbwt com a enzima de restrição *SphI* mostra o padrão de migração da amostra (vetor mais inserto) com apenas uma clivagem [Fig. 10 (b)]. A Figura 10 (c) mostra o padrão de migração de pT7-7Mbwt e de pT7-7MbGHdel após digestão com enzima de restrição *DraI*. Esta digestão mostra que *DraI* clivou apenas uma vez a primeira amostra (pT7-7Mbwt) e duas vezes a segunda amostra (pT7-7MbGHdel). A mutação de deleções N- e C- terminais MbABHdel foi verificada tal como foi comentada para as deleções das hélices AB e H. A Figura 9 mostra que a digestão enzimática com *NdeI* e *Sall* foi capaz de promover a liberação de um pequeno fragmento de DNA de ~300 pb.

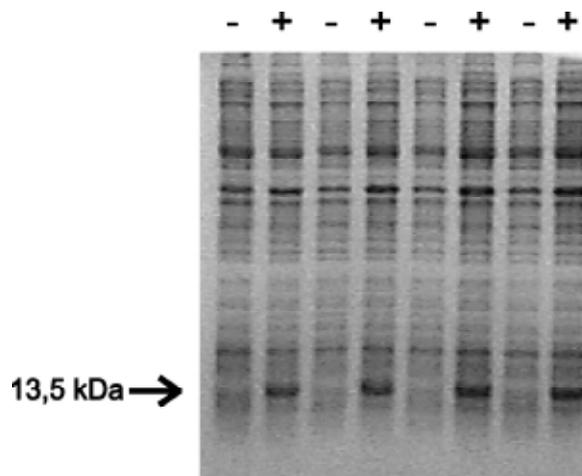


**Figura 10:** Análise dos mutantes de deleção das hélices GH. O gel de agarose mostra os perfis de bandas das amostras dos plasmídeos pT7-7Mbwt e pT7-7MbGHdel. (a), Amostras não digeridas. (b), Amostras após a digestão com a enzima de restrição *SphI*. (c) Amostras após digestão com *DraI*. A digestão com *SphI* mostra o padrão de migração da amostra com uma clivagem. A digestão com *DraI* mostra a diferença do padrão de digestão entre os dois plasmídeos testados. Os marcadores de pares de base (pb) estão indicados pelas setas.

## EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS MUTANTES

Mutante MbHdel foi expresso em BL21(DE3) após a adição de IPTG e apresenta massa molecular de ~13,5 kDa. O resultado está mostrado na figura 11. A purificação desta proteína foi obtida utilizando corpos de inclusão produzidos durante o processo de expressão.

O sobrenadante das bactérias lisadas apresentou uma banda de proteína com massa molecular de ~13,5 kDa, além de grandes quantidades de proteínas contaminantes com massas moleculares acima de 13,5 kDa (Figura 11). O precipitado desta centrifugação também apresentou uma banda com a mesma massa molecular. No entanto, esta amostra apresentou uma quantidade menor de proteínas contaminantes (Figura 11). A solubilização deste precipitado em tampão de solubilização de corpos de inclusão não permitiu uma boa visualização do resultado em gel de SDS (Figura 11). Após a remoção do tampão de solubilização contido na amostra anterior foi possível observar uma banda com 13,5 kDa, contendo uma menor quantidade de impurezas. Parte destas impurezas foram visualizadas no precipitado formado após a diálise em



**Figura 11:** Expressão de MbHdel em larga escala. A expressão das proteínas foi induzida de acordo com o protocolo para formação de corpos de inclusão. Os sinais negativos e positivos representam a ausência (-) e presença (+) de 0,4 mM de IPTG, respectivamente. A seta mostra a região de massa molecular igual a 13,5 kDa. Os experimentos de expressão foram realizados com quatro repetições independentes. A proteína MbHdel é expressa por IPTG e apresenta migração igual a massa molecular esperada de uma mioglobina sem a hélice H.

tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4 (Figura 11).

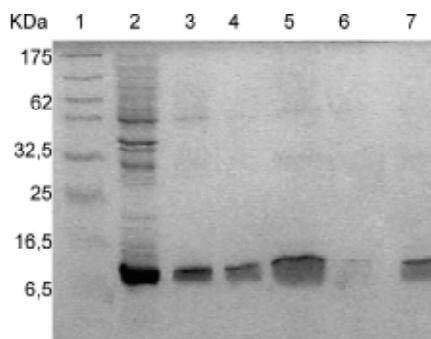
A Figura 12 mostra a grande redução de proteínas contaminantes da amostra oriunda de corpos de inclusão após a diálise em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4. Estes contaminantes foram reduzidos ainda mais após a diálise à pH 6,0 com tampão tris – acetato 20 mM. A Figura 13 mostra a migração relativas das Mbs selvagem (\*) de ~17 kDa e da Hdel (\*\*) de ~13,5 kDa e o grau de pureza destas até esta fase de purificação.

A proteína foi purificada após passagem em coluna de DEAE, equilibrada à pH 6,0, onde os contaminantes ficaram retidos. A figura do SDS-PAGE contendo as amostras de proteínas após a passagem em coluna DEAE não está mostrada em virtude da baixa resolução das proteínas contaminantes apresentada na fotografia do gel. A concentração molar da proteína purificada foi de 61  $\mu$ M sem a presença de proteínas ligadas ao grupo heme. O rendimento de purificação foi de 42 mg por litro de cultura de bactérias induzidas à expressão.

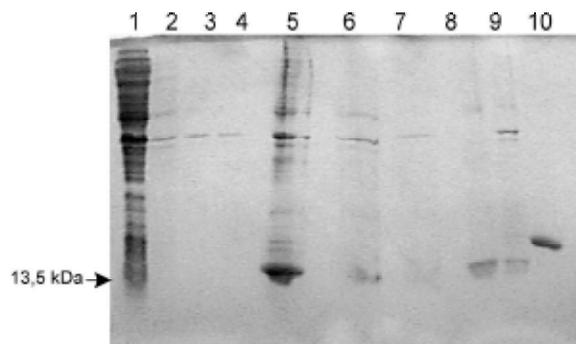
O mutante MbGHdel foi expresso em BL21(DE3) e o resultado está mostrado na Figura 14. A Figura 15 mostra parte do resultado de sua purificação a partir de corpos de

inclusão, onde é apresentado o perfil de bandas do extrato solúvel, após o rompimento da bactéria e centrifugação da mesma a 17.700xg por 30 min. Nesta fração é possível observar a banda correspondente a MbGHdel de aproximadamente 11 kDa. Nessa centrifugação, um precipitado de coloração bege, semelhante ao observado na purificação de Mbwt, foi formado. Este precipitado, após tratamento com tampão de solubilização de corpos de inclusão, resultou em uma proteína de ~11 kDa (Figura não apresentada). Este material dialisado em tampão tris-HCl 50 mM (pH 7,4) apresentou uma redução significativa da quantidade de proteínas contaminantes (Figura 15 A), principalmente de proteínas com massa molecular entre 30 e 40 kDa. A Figura 15 B mostra que a segunda diálise, mudando o pH de 7,4 para 6,0, ocasionou a precipitação de grandes quantidades de proteínas contaminantes. No entanto, houve precipitação de pelo menos 50% da proteína de interesse. A diálise das amostras à pH 6,5 preveniu a precipitação excessiva de MbGHdel, mantendo a precipitação de proteínas contaminantes. Esta proteína foi purificada em coluna de DEAE, equilibrada à pH 6,5, onde

o restante das proteínas contaminantes ficaram retidas. A proteína purificada apresentou concentração igual a 258  $\mu$ M e não foi verificada a presença de grupo heme. O rendimento de purificação foi de 77 mg por litro de cultura de bactérias.



**Figura 13:** SDS-PAGE para verificação da pureza da purificação de MbHdel. Linha 1, padrão de massa molecular (kDa). Linha 2, amostra de proteínas em corpos de inclusão utilizadas na purificação de MbHdel. Linha 3, amostra de proteínas da solubilização de corpos de inclusão que foram dialisadas em tampão tris-HCl 50 mM (pH 7,4). Linhas 4 - 5, amostras com volumes crescentes de MbHdel após diálise em tampão tris - acetato 20 mM pH 6,0. Linha 6, amostra do precipitado após diálise e centrifugação da amostra anterior. Linhas 7 e 8, comparação da diferença de migração de MbHdel (\*\*)\*e Mbwt (\*), respectivamente, mostrando o grau de pureza destas proteínas.

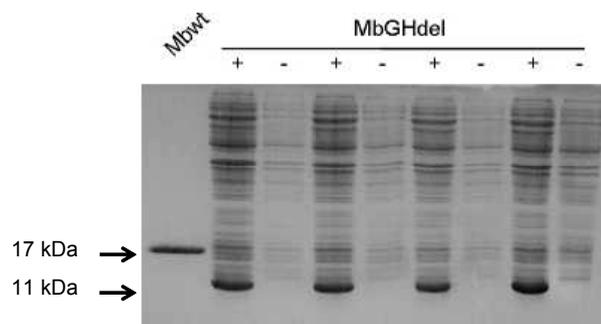


**Figura 12:** SDS-PAGE das etapas de purificação de MbHdel a partir de corpos de inclusão. Linha 1, amostra do sobrenadante do extrato total de BL21(DE3) após centrifugação à 17700xg por 30 min. Linhas 2-4, amostras dos sobrenadantes após lavagem dos corpos de inclusão e centrifugação. Linha 5, amostra do precipitado da centrifugação dos corpos de inclusão. Linha 6, amostra de corpos de inclusão solubilizados com tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo guanidina-HCl 6M e triton X-100 0,05%. Linha 7, amostra do passo anterior diluída 2 vezes com tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4. Linha 8, amostra do sobrenadante da centrifugação da amostra (7) após sua diálise em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4. Linha 9, amostra do precipitado após a diálise da amostra (7). Linha 10, Mbwt, padrão de referência de migração, purificada a partir de corpos de inclusão. A seta indica a massa molecular da proteína de interesse (kDa).

## Discussão

As hélices N- e C- terminais de Mbwt estão denominadas A, B, G e H e estão associadas a formação de intermediários na via de enovelamento desta proteína<sup>2,8-12</sup>. Uma estratégia para poder entender a importância dessas hélices na estruturação e formação dos intermediários e estado nativo da Mbwt é a combinação de deleções das hélices A, H, AB, ABH, GH, AGH, AH e/ou ABGH. Estes mutantes de deleção foram clonados, contudo os mutantes Adel, AGHdel, ABdel, ABGHdel e ABHdel não expressaram. Problemas de expressão de proteínas podem estar associados a diversos fatores. Por exemplo, a perda de estrutura promovida pela deleção. Ao serem expressas, as proteínas deletadas, devem estar expondo resíduos de aminoácidos que servem de seqüência motivo, que podem ser denominadas de N-degrons, para reconhecimento e sítio de atuação de enzimas proteolíticas<sup>13</sup>. Este fato impediria o acúmulo destas espécies intracelularmente durante os

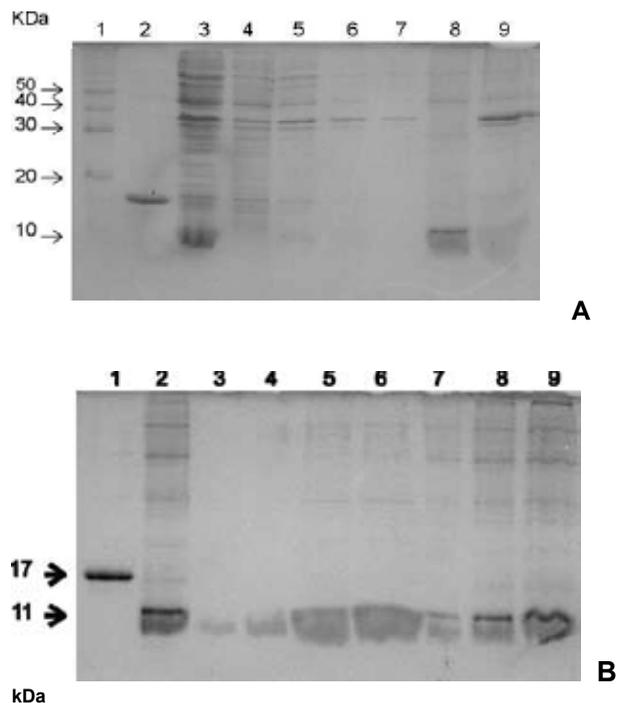
experimentos de expressão em *E. coli*. Experimentos de indução conduzidos pelo grupo de Müller mostra que a Mb de baleia com deleções das hélices A e H, grande parte da B e quase toda a extensão da hélice G (Mb29-105 - microMb) atinge sua máxima expressão após 1h da adição de IPTG 1mM e decresce após este tempo de indução<sup>11</sup>. A baixa expressão desta proteína em relação à Mbwt sugere uma alta susceptibilidade da microMb ao ataque de proteases intracelulares<sup>14</sup>. Em acordo com nossa hipótese, esta microMb (forma apo) apresentou um espectro de CD de uma proteína com estrutura secundária randômica (desestruturada)<sup>14</sup>. Esta microMb (Mb29-105) poderia também estar expondo as sequências motivos na parte N-terminal (N-degrons).



**Figura 14:** Indução em larga escala de MbGHdel. As proteínas foram induzidas de acordo com o protocolo para formação de corpos de inclusão. Mbwt (mioglobina controle) purificada a partir de corpos de inclusão. MbGHdel, mioglobina induzida em BL21(DE3) na presença (+) e ausência (-) de IPTG 0,4 mM. Os experimentos de indução foram realizados com quatro repetições independentes. As setas indicam as regiões de migração de 17 kDa e 11 kDa.

### EXPRESSION E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Mbwt, MbΔH e MbΔGH expressaram e as proteínas sintetizadas foram armazenadas em corpos de inclusão<sup>15</sup>. O protocolo, que tem sido aplicado para esta purificação, foi desenvolvido para a obtenção de holoMbwt (grupo heme ligado à mioglobina). No entanto, esta proteína teria que ser submetida a um outro tratamento para remoção do grupo heme para obtenção



**Figura 15:** SDS-PAGE das etapas de purificação de MbGHdel a partir de corpos de inclusão. Gel A - Linha 1, amostra do padrão de massa molecular (kDa); linha 2, amostra de Mbwt purificada; linha 3, amostra do extrato bruto da BL21(DE3) transformada com pT7-7MbGHdel e induzida com IPTG 0,4 mM; linha 4, amostra semelhante à 3, mas sem o tratamento com IPTG; linhas 5 a 7, amostras das lavagens dos corpos de inclusão; linha 8, amostra do sobrenadante da solubilização de corpos de inclusão que foram dialisadas em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4; linha 9, amostra do precipitado após a diálise da amostra anterior. A diálise à pH 7,4 reduziu significativamente os contaminantes da purificação. Gel B - Linha 1, amostra de Mbwt purificada (17 kDa); linha 2, amostra do sobrenadante de proteínas da solubilização de corpos de inclusão que foram dialisadas em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4; linhas 3 a 6, concentrações crescentes de MbGHdel dialisadas em tampão tris - acetato 20 mM pH 6,0; linhas 7 a 9, amostras com volumes crescentes do precipitado formado durante a diálise do passo anterior. Ocorreu precipitação de ~50% de MbGHdel após a diálise de pH 7,4 para 6,0.

de apoproteínas. Com o objetivo de facilitar a obtenção destas apoproteínas, outras vias de purificação foram tentadas. A alternativa encontrada para a solução deste problema foi a purificação de proteínas a partir de corpos de inclusão. Estas estruturas normalmente são produzidas em *E. coli* em resposta à mudança brusca de temperatura (choque térmico) e/ou quando os produtos de expressão têm a tendência à formação de agregados no citoplasma

da bactéria. Nesta situação as proteínas são estocadas nessas estruturas<sup>8</sup>. A mudança de temperatura de 37°C para 42°C, logo após a adição de IPTG, e expressão por 5 horas. A superexpressão de ApoMb associada ao choque térmico faz com que esta proteína seja estocada nos corpos de inclusão sem que haja associação de grupos heme à mesma. Estes corpos de inclusão foram verificados quando efetuou-se a lise das bactérias seguida pela centrifugação deste lisado. A centrifugação levou à separação de duas porções. Uma delas era solúvel e provavelmente continha holoMbwt. Esta afirmação vem da observação da coloração ligeiramente avermelhada do sobrenadante provavelmente devida à oxidação do grupo heme que está ligado à Mbwt. A outra porção corresponde a fração que contém os corpos de inclusão. Este experimento mostrou que a porção precipitada continha grande quantidade da proteína de interesse e uma quantidade menor de contaminantes do que a porção solúvel.

Devido à estrutura dos corpos de inclusão, que são estruturas membranosas onde as proteínas são estocadas, foram utilizados guanidina-HCl e um detergente aniônico para seu rompimento. Para estes reagentes serem removidos sem que ocorresse precipitação da proteína de interesse optou-se por fazer uma diluição desta amostra com tampão tris-HCl pH 7.4 de forma a decrescer a concentração de guanidina-HCl para 3 M e conseqüentemente reduzir a concentração de proteína em solução. Uma maior quantidade de proteínas pode favorecer a agregação, algo que é inerente à apoMb em determinadas condições. Esta amostra foi então dialisada com o mesmo tampão de diluição e o resultado foi uma redução das proteínas contaminantes, por precipitação, observada no extrato sem que houvesse precipitação significativa da proteína de interesse.

Todo este trabalho resultou na purificação de apoMbwt com uma pequena contaminação de holoMbwt que foi calculada com um valor em torno de 0,04%. Este resultado constitui um avanço para o processo de obtenção de apoMbwt, pois elimina uma etapa de purificação que é a remoção de grupo heme da holoMb.

Os protocolos de expressão e purificação das proteínas mutantes foram os mesmos utilizados para obtenção da proteína selvagem. A expressão de MbHdel

e MbGHdel foi em menor quantidade do que a observada para Mbwt. Este resultado pode ser confirmado através do rendimento de purificação obtido para estes mutantes em relação à Mbwt. O rendimento de purificação de Mbwt foi 3 vezes maior que o rendimento de purificação de MbHdel e esta diferença caiu para metade quando a Mbwt foi comparada com MbGHdel. Um menor rendimento, seja por problemas durante a expressão ou purificação, é algo comum no caso de mutantes de Mb.

As proteínas mutantes apresentaram comportamentos diferenciados com relação a solubilidade à pH 6,0. As Mbs wt e Hdel apresentaram-se bastante solúveis neste pH, enquanto que a proteína de deleção das hélices GH precipitou, em pelo menos 50% da sua quantidade total, quando a diálise foi realizada para este pH. A elevação do pH para valores  $\geq 6,5$  restaurou a solubilidade desta proteína, possibilitando sua purificação em colunas de troca iônica. Além da avaliação da solubilidade relativas dos mutantes de deleção, que pode ser usada como um parâmetro de estabilidade em solução, é importante que se faça uma caracterização mais detalhada sobre sua estrutura utilizando técnicas espectroscópicas, como por exemplo o dicroísmo circular que permite a quantificação da estrutura secundária de uma proteína, e sua função através de testes sobre a capacidade de estes mutantes em ligar o grupo heme, ligante importante para a função que a mioglobina tem de armazenar oxigênio nos músculos.

## BIBLIOGRAFIA

1. a) Hughson, F. M, Wright, P. E., Baldwin, R. L. *Science* 249, **1990** : 1544-1548; b) Jaenicke, R. *Prog. Bioph. Mol. Biol.* 71, **1999**: 155-241.
2. a) Loh, S. N., Kay, M. S. and Baldwin, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 **1995**: 5446-5450; b) Matthews, C. R. *Annu. Rev. Biochem.* 62 **1993**: 653-683; c) Pace, C. N. and Schmid, F. X. How to determine the molar absorbance coefficient of a protein. In: *Protein Structure: A practical approach*. Creighton, T. E. (Ed.) second edition. Oxford University Press, New York, U.S.A. **1997**; d) Ptitsyn, O. B. *FEBS Lett.* 285 **1991** (2): 176-181.

3. a) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press (Ed.). New York, United State of America **1989**; b) Studier, W. F., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W. *Meth. Enzymol.* 185 **1990**: 60-89; c) Takano, T. *J. Mol. Biol.* 110 **1977**.
4. a) Landt, O., Grunert, H-P. and Hahn, U. *Gen.* 96, **1990**: 125-128. b) Levinthal, C. *J. Chim. Phys.* 65, **1968**: 44-45.
5. Laemmli, U. K. *Nature* 277 **1970**: 680-685.
6. Edelhoch, H. *Biochemistry* 6 **1967**: 1948-1954.
7. Kiefhaber, T. and Baldwin, R. L. *J. Mol. Biol.* 252 **1995**: 122-132.
8. Jamin, M and Baldwin, R. L. *Nature Str. Biol.* 3 **1996**: 613-618.
9. Eliezer, D., Yao, J. Dyson, H. J. and Wright, P. E. *Nature Str. Biol.* 5 **1998**: 148-155.
10. Varshavsky A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 **1996**: 12142 – 12149.
11. a) Grandori, R. Schwarzinger, S. and Müller, N. *Eur. J. Biochem.* 267 **2000**: 1168 – 1172; b) Griko, Y. V., Privalov, P. L., venyaminov, S. Y. and Kutysenko, V. P. *J. Mol. Biol.* 202 **1988**: 127-138.
12. Jennings, P. A., Stone, M. J. and Wright, P. E. *J. Biomol. NMR.* 6 **1995**: (3) 271-276.
13. a) Karasuyama H. and Melchers, F. *Eur J Immunol* 18 **1988**: (1) 97-104; b) Kay, M. S., Ramos, C. H. I. and Baldwin, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 **1999**: 2007-2012.
14. Marston, F. A. O. and Hartley, D. L. Solubilization of protein aggregates. In: Guide to protein purification. Deutscher, M. P. (Ed). *Methods in enzymology*, Vol 18. San Diego, Academic Press **1990**.
15. Jennings, P. A. and Wright, P.E. *Biochemistry.* 38 **1999**: 9783-9790.

---

## Euripedes A. Ribeiro Jr\*<sup>1</sup>

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, PO Box 6192, Campinas SP, 13084-971 Brasil.

<sup>1</sup>Departamento de Química, Faculdade de Tecnologia Serviço Nacional de Aprendizado Industrial (SENAI) Roberto Mange, Anápolis, Brasil

\*E-mail: ribeiro@embl.fr

# Cromatografia Quiral no Desenvolvimento de Novas Drogas

Fernando Petacci e Sílvia de Sousa Freitas

A quiralidade é um aspecto fundamental no desenvolvimento de drogas, tendo em vista que é necessário conhecer e descrever alvos biológicos para projetar drogas eficazes. A cromatografia enantioselectiva tem ampliado seu papel na indústria farmacêutica tanto como ferramenta analítica para a análise da quiralidade quanto como técnica preparativa para obter enantiômeros puros em larga escala, a partir de racematos de maneira rápida. Diferentes técnicas cromatográficas enantioselectivas são discutidas aqui, com ênfase nas mais difundidas: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia por fluido supercrítico (CFS). O desenvolvimento das fases estacionárias quirais (FEQs), que tornaram CLAE e CFS indispensáveis na descoberta de novas drogas, também é discutido.

**Palavras-chave:** *cromatografia enantioselectiva; desenvolvimento de drogas; fases estacionárias quirais.*

The chirality is a fundamental aspect in drug development because it is necessary to understand and describe biological targets as well as to design effective pharmaceutical agents. Enantioselective chromatography has played an increasing role on the pharmaceutical industry, both as analytical tool for chiral analysis also as preparative technique to obtain pure enantiomers from racemates in large scale, quickly. Different enantioselective chromatography techniques are discussed here, with particular emphasis on the most widespread: high performance liquid chromatography (HPLC) and supercritical fluid chromatography (SFC). The development of chiral stationary phases (CSPs), that have made HPLC and SFC indispensable techniques for drug discovery, is discussed too.

**Key-words:** *enantioselective chromatography; drug development; chiral stationary phase.*

## Introdução

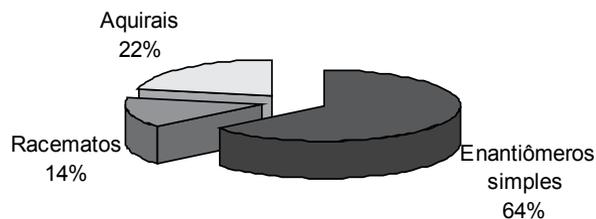
De maneira geral, o funcionamento dos organismos vivos é baseado em moléculas quirais, ou seja, aquelas que contêm um centro que confere assimetria à molécula, como, por exemplo, um átomo de carbono, silício, fósforo, entre outros. A atividade farmacológica de dois enantiômeros pode diferir consideravelmente e às vezes ser muito semelhante. Esta diferença de comportamento está relacionada ao mecanismo de ação a nível molecular, pois um dos enantiômeros pode possuir maior complementaridade estérica ao receptor em relação ao seu antípoda. Assim, esses compostos podem apresentar diferentes perfis farmacodinâmicos e farmacocinéticos, que podem resultar em diferenças na biodisponibilidade plasmática e toxicológica.<sup>1,2</sup> Por esse motivo o FDA tem solicitado avaliações clínicas de enantiômeros isoladamente,<sup>3</sup> o que fez a indústria farmacêutica dar ênfase no desenvolvimento de drogas enantiomericamente puras.<sup>4,5</sup> Levantamento feito por Agranat<sup>6</sup> sugere que o número de drogas com apenas um enantiômero é maior que aquelas oriundas de misturas racêmicas e drogas aquirais (Figura 1).

Desta maneira, metodologias para a obtenção de enantiômeros puros vêm sendo desenvolvidas, seja por síntese assimétrica, seja por resolução de misturas racêmicas. Nesse artigo, nos deteremos ao processo de separação de misturas racêmicas. Na década de 1970, uma mistura racêmica de Talidomida foi separada em poliamida opticamente ativa,<sup>7</sup> o que impulsionou o desenvolvimento de outras fases estacionárias quirais.

Os métodos de separação quiral podem ser divididos em duas categorias: método direto, indireto. O método direto é baseado na formação de um diastereoisômero através da interação com a fase estacionária ou na fase móvel.<sup>8</sup> O outro é um método indireto, onde há a formação de diastereoisômeros pela reação com um reagente quiral, e posterior separação da mistura diastereoisomérica formada. Classicamente, a separação de enantiômeros por cromatografia é feita pelo método indireto através da formação de misturas diastereoisoméricas que, devido às diferenças nas suas propriedades termodinâmicas, podem ser separadas por fases estacionárias aquirais. Embora essa metodologia tenha a vantagem de utilizar fases convencionais, a formação dos diastereoisômeros

nem sempre é tarefa fácil. Nos modos preparativo e semi-preparativo ainda tem o inconveniente de isolar os diastereoisômeros e então fornecer os enantiômeros iniciais, tornando o trabalho indireto penoso.

Uma alternativa na separação de enantiômeros é a separação direta, usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia por Fluido Supercrítico (CFS) com Fases Estacionárias Quirais (FEQ), tanto no modo analítico quanto no modo preparativo de maneira mais rápida, com alta robustez e eficiência, o que torna essas técnicas fundamentais no processo de desenvolvimento de novas drogas<sup>9,10</sup>. Desta forma, a separação direta usando FEQ's vem sendo preferida aos métodos indiretos, como derivatizações e adições de aditivos quirais à fase móvel, já que reduz etapas de manipulação das amostras. No decorrer deste trabalho trataremos especificamente de separações diretas utilizando as FEQ's mais utilizadas no processo de obtenção de descoberta de novas drogas.



**Figura 1:** Distribuição de drogas aprovadas pelo FDA entre janeiro-agosto de 2003<sup>6</sup>.

De maneira ampla, podemos classificar os métodos de cromatografia enantioseletiva em quatro categorias:<sup>11</sup>

### CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

A CG com fases quirais oferece vantagens como altas resolução e eficiência de coluna, além da simplicidade da fase móvel. Na indústria farmacêutica é útil na separação de compostos usados em síntese assimétrica que não são prontamente separados ou detectados por cromatografia líquida. A grande limitação de CG é que apenas compostos voláteis e termicamente estáveis podem ser analisados por essa técnica. No caso de CG quiral, há também que se relatar que, devido às altas temperaturas a que são expostas, as fases quirais racemizam, diminuindo a eficiência das separações. Outra séria limitação da CG

no desenvolvimento de fármacos é a dificuldade de se realizar separações em escala preparativa.

### ELETROFORESE CAPILAR (EC)

Devido à alta resolução desta técnica, a mesma tem se estabelecido como importante ferramenta na separação analítica de misturas enantioméricas, sendo aplicada com sucesso a uma grande variedade de moléculas quirais<sup>12, 13</sup>. Em EC, o seletor quiral é adicionado à fase móvel, formando uma pseudo-fase. Devido ao fato de tanto o analito quanto o seletor quiral terem diferentes mobilidades eletroforéticas na mesma fase, a separação é baseada na enantioseletividade das interações, que pode ser descrita como Cromatografia Eletrocínética Capilar<sup>14</sup>. As aplicações da EC em análises farmacêutica e biomédicas fizeram com que essa técnica fosse inserida nas farmacopéias americana e européia<sup>10, 15</sup>.

No entanto, como acontece com a cromatografia gasosa, a EC necessita de ambientes capilares para se obter alta eficiência na separação. Assim, a utilização dessa técnica no modo preparativo é impraticável, o que exclui a EC nas fases iniciais do desenvolvimento de novas drogas, que necessitam de quantidades relativamente grandes dos enantiômeros puros para os ensaios farmacológicos.

### CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Técnica mais amplamente utilizada na separação quiral de moléculas de importância na indústria farmacêutica, a CLAE-FEQ teve um grande desenvolvimento nas últimas duas décadas<sup>16, 17</sup>. A grande vantagem da CLAE para resolução de misturas de moléculas quirais é a flexibilidade na utilização dessa técnica tanto no modo analítico quanto no preparativo, sem variar a eficiência da técnica. A técnica permite redimensionamento da quantidade de analito a ser separada apenas pelo redimensionamento da coluna ou do uso de técnicas marginais, como CLAE reciclante, nas escalas de laboratório (< 100 g) ou em escala de processos (> 100 g de enantiômeros puros).

### CROMATOGRAFIA POR FLUÍDO SUPERCRTICO (CFS)

Nos últimos anos, a CFS com colunas empacotadas quirais têm tido um rápido avanço, que pode ser observado no grande crescimento da sua utilização industrial, bem

como pelo aumento substancial nas vendas desse tipo de equipamento<sup>18</sup>. Nesse modo de cromatografia é usado fluido no estado supercrítico ou próximo ao supercrítico como fase móvel, como CO<sub>2</sub>. Isso proporciona separações de três a cinco vezes mais rápidas do que em CLAE, devido à alta difusibilidade (velocidade linear ótima) e à menor viscosidade da fase móvel<sup>19</sup>. Essa diminuição no tempo de separação tem conseqüências positivas tanto em separações analíticas quanto preparativas na descoberta de novas drogas.

Sendo uma opção na separação e purificação de misturas enantioméricas, os principais benefícios dessa técnica frente as acima citadas são<sup>10</sup>:

- i. Alta resolução por unidade de tempo, rápido re-equilíbrio da coluna, composição simples da fase móvel, o que resulta no desenvolvimento mais rápido de método e análise em comparação com CLAE;
- ii. Habilidade única de se modificar a força da fase móvel variando apenas pressão e temperatura (viscosidade);
- iii. Compatibilidade com todos os seletos quirais usados em CLAE e CG, sendo boa técnica complementar;
- iv. Maior compatibilidade do CO<sub>2</sub> com solventes polares em comparação com hexano, gerando maior flexibilidade na escolha de solvente para fase móvel;
- v. Alta taxa de produção cromatográfica associado à baixa utilização de solventes orgânicos, tornando a técnica ambientalmente favorável;
- vi. A combinação das vantagens da CG associado à não limitação a altas temperaturas;
- vii. Compatível com todos os detectores de CLAE e CG.

Como exposto acima, CLAE e CFS são as técnicas mais amplamente utilizadas para se fazer separações enantioseletivas. A discriminação quiral nas FEQ's em CLAE e CFS são resultado das diferenças de energia entre os complexos diastereoisoméricos formados pelas interações entre os solutos e as FEQ. Há uma estimativa de que aproximadamente 1300 FEQ tenham sido preparadas, sendo que mais de 200 delas são encontradas comercialmente.<sup>20</sup> Portanto, o conhecimento e classificação das diferentes FEQ's é fundamental para selecionar a mais apropriada para resolver um dado problema. A Tabela 1 mostra os seis tipos de FEQ's mais utilizadas e suas capacidades de separação típicas, bem

como uma descrição sucinta de como cada uma atua no processo de separação.

## Discussão

### TIPO PIRKLE

Esse tipo de FEQ requer interações do tipo  $\pi - \pi$  entre o soluto e a FEQ. Simultaneamente, outros tipos de interações intermoleculares, como pontes de hidrogênio e dipolo-dipolo, atuam. Pelo fato dessas interações serem favorecidas em solventes apolares, essas FEQ são utilizadas no modo normal, apesar de também poderem ser utilizadas no modo reverso, particularmente para compostos iônicos e altamente polares. Os seletores quirais são ligados a uma superfície porosa e essa fase estacionária é responsável pela separação. Inovações têm sido apresentadas quanto às fases utilizadas em CFS, especialmente colunas à base de polisiloxanas, com alta seletividade, eficiência e reduzido tempo de retenção para CFS. Colunas a base de zircônio não poroso, estáveis a diversos pH's, têm-se mostrado boas alternativas na redução de tempo de análise em CFS.

### POLISSACARÍDEOS DERIVATIZADOS

Derivados  $\gamma$ -aminopropil da celulose e da amilose suportados em sílica silanizada (Chiralcel<sup>®</sup> e Chiralpack<sup>®</sup>,

respectivamente) são as FEQ mais populares. Devido a suas altas capacidades, eficiência na separação e versatilidade, elas dominam a aplicações de FEQ's na indústria farmacêutica<sup>10</sup>. Basicamente quatro tipos de derivados podem ser preparados por modificação dos grupos hidroxila livres do polissacarídeo: ésteres orgânicos, nitratos, carbamatos e éteres. Os carbamatos e éteres são os derivados mais promissores como FEQ's<sup>21</sup>.

Essas FEQ's atuam tanto no modo normal quanto no reverso em CLAE e CFS. No modo normal, diferentes álcoois ou diferentes concentrações de álcoois resultam em diferentes enantioseletividades. No modo reverso, moléculas altamente polares e compostos biológicos são os principais analitos. As misturas binárias entre acetonitrila-álcool e álcool-álcool são as fases móveis mais utilizadas neste modo, gerando boas resoluções com baixo tempo de análise aliados a uma larga faixa de solubilidades.

O principal inconveniente desses polissacarídeos como FEQ é que eles são ligados à superfície de sílica, sendo compatíveis com apenas alguns solventes. Novas fases derivadas da amilose tri-(3,5-dimetil-fenil)-carbamato tem mostrado alta durabilidade em todos os solventes orgânicos, aumentando a faixa de seleção de fases móveis para essas FEQs.

**Tabela 1:** Tipos de fases quirais e suas capacidades de separação usuais<sup>9</sup>

Tipo de Fase Estacionária Quiral (FEQ)	Capacidade Média (mg soluto/ g FEQ)
Pirkle	1-50
Derivados de polissacarídeos	5-150
Macrocíclicos	
Ciclodextrinas (naturais e derivatizadas)	0,1-5
Glicopeptídeos	0,1-5
Éteres coroa quirais	0,1-5
Ligante de troca	0,1-1
Proteínas	0,1-0,2
Outros polímeros	1-100

## MACROCÍCLICOS

Ciclodextrinas (CD), glicopeptídeos e éteres coroa-quirais são os principais representantes dessa classe de FEQ's. Ciclodextrinas e glicopeptídeos são os seletores mais utilizados em eletroforese capilar, enquanto ciclodextrinas em cromatografia gasosa. Porém, esses macrocíclicos são pouco utilizados em CLAE e CFS.

As CD derivatizadas foram introduzidas por Armstrong,<sup>22</sup> e hoje temos uma grande variedade de CD derivatizadas que são utilizadas como FEQ multi-modais. As mais utilizadas são hidroxipropil- $\beta$ -CD e derivados aromáticos de CD. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos derivados do amido e podem ser obtidas contendo de seis a doze unidades de glicose. Porém, apenas as CD com seis ( $\alpha$ ), sete ( $\beta$ ) e oito ( $\gamma$ ) unidades de glicose são encontradas comercialmente. A molécula de ciclodextrina tem uma cavidade hidrofóbica e uma superfície hidrofílica com número variado de unidades hidroxila<sup>21</sup>.

Os glicopeptídeos também foram introduzidos por Armstrong e colaboradores e, hoje, quatro tipos de FEQ's são encontradas comercialmente: *Vancomycin*, *ristocetin*, *teicoplanin* e *teicoplanim aglycon*<sup>10</sup>. Essas quatro FEQ's são utilizadas de maneira complementar na separação de várias moléculas quirais, em qualquer modo de eluição<sup>23</sup>. Uma das mais notáveis vantagens dos glicopeptídeos como FEQ's é a capacidade de separar amino-ácidos *in natura* (sem derivatização) apenas com sistemas binários simples. Na prática *teicoplanin* e *teicoplanim aglycon* tem mostrado maior enantioseletividade nas separações do que *vancomycin* e *ristocetin*.

Os éteres coroa-quirais são ferramentas na separação de moléculas quirais contendo grupos amino primários (modo reverso e fase móvel acidificada). O reconhecimento quiral nessa FEQ é baseado na formação de um complexo de inclusão entre o grupo amino primário (na forma de iônica) e o éter quiral. Compostos com grupos amino secundários, como bloqueadores  $\beta$ , têm sido resolvidos com sucesso usando essas FEQ's.<sup>24</sup>

## LIGANTE DE TROCA

Esse tipo de FEQ consiste em um ligante bidentado quiral ligado à coluna. Para haver separação, é necessário que a molécula quiral forme um complexo

de coordenação com um metal de transição presente na fase móvel como aditivo ( $\text{Cu}^{2+}$  é o mais usado). Essas FEQ's geram excelentes separações para amino-ácidos, derivados de amino-ácidos e amino-álcoóis. Tendo em vista que os complexos entre o soluto e o cobre absorvem na região do UV-visível não há necessidade do composto ter grupos cromóforos para ser detectado neste tipo de detectores. Porém, a sensibilidade na detecção é bastante comprometida devido a ruídos gerados pela fase móvel.

## PROTEÍNAS

Proteínas são usadas como FEQ's em separações analíticas. Devido ao sua baixa estabilidade e altos preços em relação a outras FEQ's, elas tem sido pouco usadas. Outro aspecto negativo é que essas FEQ's podem ser utilizadas apenas no modo reverso, além de ter uma baixa capacidade de separação (Tabela 1).

## OUTROS POLÍMEROS

Outros polímeros quirais como dialiltartrinine amide e poliácridamida também vem sendo utilizadas, especialmente para fins preparativos.

## Considerações finais

Cromatografia enantioseletiva, especialmente CLAE e CFS com fases estacionárias quirais, é uma ferramenta indispensável no processo de descoberta e desenvolvimento de novas drogas, seja pela análise da quiralidade, seja na preparação de novas moléculas. Há de se salientar ainda a maior rapidez no acesso a enantiômeros puros em relação aos processos de síntese tradicionais. É indiscutível que a cromatografia enantioseletiva quiral preparativa tome cada vez mais espaço nas linhas de produção da indústria farmacêutica, tendo em vista a alta capacidade para se obter enantiômeros puros. Para isso ainda são necessárias disponibilidade (menores preços) e robustez dos equipamentos em relação aos métodos clássicos. Com o desenvolvimento de novas FEQ's o reconhecimento de discriminação quiral a nível molecular fica indispensável para que, num futuro próximo, tenhamos maior agilidade na escolha de uma FEQ para separar um dado enantiômero, ganhando em agilidade e seletividade.

## REFERÊNCIAS

1. Ahuja, S. Em *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*; Aboul-Enein, H. Y.; Wainer, I. W., eds, Wiley, New York, **1997**.
2. Caldwell, J.; *J. Chromatogr. A.* **1996**, 719, 3.
3. FDA's Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs May 1, 1992; Update July 6, **2005**; <http://www.fda.gov/cder/guidance/stereo.htm>, acessado em 07/11/2007.
4. Ahuja, S.; *Chiral Separations: Applications and Technology*, Oxford University Press, Oxford, **1996**.
5. Ahuja, S.; *Chiral Separation by Chromatography*, Oxford University Press, Oxford, **2000**.
6. Agranat, I. Caner, H.; Groner, E.; Levy, L.; *Drug Discov. Today* **2004**, 9, 105.
7. Blaschke, G.; H.P. Kraft, K. Fickentscher, F. Kohler, *Arzneim.-Forsch.* **1979**, 29, 1640.
8. Haginaka, J.; Em *Encyclopedia of Separation Science*; I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, C.F. Poole, eds, Academic Press, New York, **2000**.
9. Francotte, E.R.; *J. Chromatogr. A.* **2001**, 906, 379.
10. Zhang, Y.; Wu, D-R.; Wang-Iverson, D. B.; Tymiak, A. A.; *Drug Discov. Today* **2005**, 10, 571.
11. Ying, L.; Lantz, A.W.; Armstrong, D.W.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2004**, 27, 1121.
12. Camilleri, P.; *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, 2nd ed, CRC Press, Boca Raton, **1998**.
13. Kang, J.; Wistuba, D.; Schurig, V.; *Electrophoresis* **2002**, 23, 4005.
14. Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.; *Anal. Chem.* **1984**, 56, 111.
15. Scriba, G.K.W.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, 27, 373.
16. Krstulovic, A.M. *Chiral Separations By HPLC, Application To Pharmaceutical Compounds*, Ellis Horwood Series, **1989**.
17. Subramanian, G.; *A Practical Approach To Chiral Separations By Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, **1994**.
18. Terfloth, G.; *J. Chromatogr. A.* **2001**, 906, 301.
19. Phinney, K.W.; *Anal. Chem.* **2000**, 72, 204A.
20. Francotte, E.R. (2003) *Enantioselective chromatography for the preparation of drug enantiomers*, ISCD-15 (Chirality 2003), Shizuoka, Japan, Oct **2003**.
21. Cass, Q.B.; Degani, A.L.G. Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação, 1ª Ed., Edufscar, Série Apontamentos, São Carlos, **2001**.
22. Armstrong, D.W.; Chen, S.; Chang, C.; Chang, S.; *J. Liq. Chromatogr.* **1992**, 15, 545.
23. Xiao, T.L. Zhang, B.; Lee, J. T.; Hui, F. J.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, 24, 2673.
24. Steffek, R.J.; Zelechonok Y.; Gahm K.H.; *J. Chromatogr. A.* **2002**, 947, 301.

---

## Fernando Petacci\*<sup>1</sup> e Silvia de Sousa Freitas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão, avenida Lamartine P. Avelar, 1120, Setor Universitário, Catalão-GO 75701-020.

\*E-mail: petacci\_f@hotmail.com

# Preparação e Avaliação de Novos Nanosistemas Terapêuticos de Liberação Prolongada de Bentonita – Aciclovir

Flávia Almada do Carmo, Lúcio Mendes Cabral, Camila Braga Dornelas e Michele Villardi

Fármacos antivirais, em especial aqueles que apresentam baixa estabilidade e destinados ao uso tópico, podem ter sua eficácia farmacológica modulada pelo controle de sua liberação a partir da forma farmacêutica na qual este é veiculado. Como possibilidades para sua formulação, considera-se como mais evidente a preparação de sistemas de liberação modificada de fármacos. A nanotecnologia, em especial, excipientes a base de nanocompósitos fármaco – “silicato lamelar”, figura entre as melhores alternativas tecnológicas disponíveis para esta finalidade. Neste trabalho, tomou-se como objetivo principal o desenvolvimento de novos nanomateriais e nanocompósitos como sistemas carreadores de fármacos, focando-se, em ambos os casos, na otimização da liberação do aciclovir de forma a possibilitar seu uso como um novo sistema de liberação modificada, tanto de uso oral como de uso tópico.

**Palavras-chave:** *liberação modificada; nanocompósito; nanomaterial; aciclovir.*

For antiviral drugs, mainly those that present low stability and intended for topical use, their pharmacological effectiveness can be modulated through release control from the pharmaceutical delivery system in which it is formulated. There are some possibilities, but the preparation of modified release systems is more evident for this. Nanotechnology, with pharmaceutical active compound – silicate based, particularly, represents the best technological alternative available for this purpose. The aim of this work was to develop new nanomaterials and nanocomposites systems as drugs carriers, focusing, in both cases, the optimization of the acyclovir release to allow its use as a new system of modified release.

**Keywords:** *modified release; nanocomposite; nanomaterial; acyclovir.*

## Introdução

Na busca de novas alternativas terapêuticas para combater patologias que assolam a humanidade, novos fármacos têm surgido e outros ainda estão em pesquisa intensa dentro dos laboratórios das maiores indústrias farmacêuticas de todo o mundo<sup>1-3</sup>. Muitos destes novos fármacos, apesar de promissores em termos de sua atividade farmacológica, perdem em eficiência e aceitação visto sua baixa especificidade em relação ao alvo terapêutico, ou, ainda, sua biodisponibilidade reduzida. Ao mesmo tempo, esta mesma abordagem pode ser utilizada para “rejuvenescer” fármacos de uso consagrado em terapia, como o aciclovir, um anti-retroviral utilizado com sucesso em terapêutica desde 1977<sup>4-6</sup>.

Este fármaco apresenta, no entanto, as mesmas restrições da maioria dos quimioterápicos<sup>7</sup>, somando-se a estas sua baixa estabilidade, o que torna ainda mais problemática a sua formulação, em especial para uso tópico. A modulação de sua absorção tem sido estudada, sendo pouco explorado, todavia, o controle de sua liberação<sup>8-9</sup>. Este é um conceito específico enquadrado em um contexto mais amplo, o de liberação controlada de fármacos<sup>10-11</sup>. Para tal, um recurso evidente pode ser visto com o uso da nanotecnologia, podendo-se avaliar o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos com base em silicatos lamelares, em especial a bentonita sódica e seus derivados organofílicos, como forma de modular a liberação deste ativo<sup>12</sup>.

## Materiais e Métodos

Celulose microcristalina PH 102 (Avicel - FMC); aciclovir (Farmex – México), estearato de magnésio (Mallinkrodt); bentonita sódica, 95meq/100g de capacidade de troca catiônica (CEC) (Akros-Chemical); viscogel B8® (Bentec). HCl (Tedia), apresentavam-se em grau analítico. Água MilliQ® foi utilizada para o preparo das soluções. O pacote de software STATISTICA (Stat Soft Company - USA) foi utilizado nas análises estatísticas.

### REAÇÕES DE INTERCALAÇÃO FÁRMACO - SILICATOS LAMELARES

Foram realizados experimentos de intercalação aciclovir - bentonita sódica e aciclovir - argila organofílica, variando-se, uma a um, temperatura (ambiente e sob refluxo), concentração de aciclovir (66meq, 88meq, 150meq, 444meq e 888meq/100g de argila) e tempo (30min, 12h, 24h, 48h e 72h), empregando-se HCl 0,1N

como solvente. Como argila organofílica, foi utilizado viscogel B8®, resultante da inserção de octadecilamina na estrutura da bentonita sódica. A separação do material intercalado e não intercalado foi feita através de centrifugação (Sorvall RC2B), a 4000rpm por 1 hora. O rendimento foi estimado pela quantificação indireta da quantidade do fármaco presente no sobrenadante através de espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-Vis) (Biospectro), baseando-se nos valores da curva de calibração, previamente elaborada com aciclovir SQR em álcool etílico no comprimento de onda de 270nm, segundo compêndio oficial (USP 31).

Os materiais resultantes foram caracterizados por difração de raios X (DRX), em difratômetro Rigaku, modelo Miniflex, e espectrometria de infravermelho, em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, FTIR-8300, Shimadzu, de forma a se evidenciar a inserção do fármaco no espaço interlamelar dos silicatos lamelares estudados.

### PREPARAÇÃO DOS COMPRIMIDOS DE ACICLOVIR

Foram produzidos três lotes de comprimidos, em compressora excêntrica, Piccola, por compressão direta (Tabela 1) de aciclovir intercalado com bentonita sódica, e um lote utilizando uma mistura física de aciclovir e bentonita sódica, nas mesmas proporções utilizadas no teste de interação (66meq/100g argila). Com os comprimidos preparados foram realizados testes de dissolução (dissolutor Nova Ética), para sistemas de liberação modificada, e dureza (durômetro Scheleuniger), segundo especificações farmacopeicas (USP31). O mesmo procedimento foi conduzido com os comprimidos obtidos com aciclovir - viscogel B8®.

Tabela 1: Formulação-base dos comprimidos de aciclovir

Componente	Quantidade
Complexo Aciclovir + argila	qsp 100mg de aciclovir
Celulose microcristalina	20%
Estearato de magnésio	1,5%
	500mg

## Resultados e Discussão

### REAÇÕES DE INTERCALAÇÃO FÁRMACO – ARGILA SÓDICA

O parâmetro temperatura foi estudado a fim de avaliar sua influência sobre o processo de intercalação. A condição de elevação da temperatura (de 30° C – temperatura ambiente para refluxo, 110°C), objetivou um maior fornecimento de energia, de forma a se buscar um aumento no rendimento do processo. Os valores de rendimento são apresentados pela Tabela 2, a qual não evidencia diferença estatística entre as condições de temperatura testadas, ou seja, o aumento de temperatura para este processo não mostra qualquer vantagem. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Após a avaliação da temperatura, foi proposto o estudo da influência da concentração de aciclovir no processo, variando-se, para isso, sua quantidade em massa, de modo a obter: 66meq, 88meq, 150meq, 444meq e 888meq / 100g de argila, conservando-se a condição previamente descrita como ótima (temperatura ambiente).

Segundo os resultados apresentados pela Tabela 3, a concentração considerada ótima foi de 444meq/100g de argila sódica, porque, além de ser a que resultou em uma maior massa da aciclovir fixada na argila em comparação as menores concentrações utilizadas, apresentou a maior reprodutibilidade de resultados do que os observados com o uso de 888meq/100g de argila.

Foram, ainda, realizadas reações de intercalação entre argila sódica e aciclovir utilizando-se os seguintes tempos de reação: 30min (Figura 1), 12h, 24h, 48h e 72h. Os materiais obtidos foram analisados por difração de raios X (Figura 2), onde não foram observadas diferenças significativas quanto ao espaçamento basal nos diferentes tempos considerados.

### REAÇÕES DE INTERCALAÇÃO FÁRMACO – ARGILA ORGANOFÍLICA

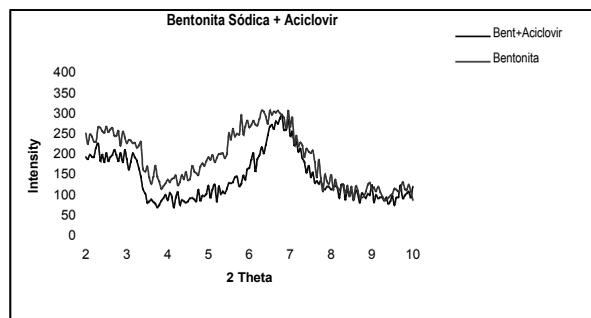
Com relação ao ensaio de intercalação do aciclovir com bentonita organofílica, este seguiu as condições previamente tidas como ótimas de aciclovir e bentonita sódica, ou: a temperatura ambiente, com 444meq/aciclovir/ 100g de argila em 30 minutos de reação.

**Tabela 2:** Rendimento da intercalação e quantidade de aciclovir intercalado em relação à temperatura

Temperatura	Abs. 270nm	meq fix/100g Arg	Rendimento de intercalação(%)
30°C	0,462	12,0	18,2
	0,476	10,0	15,1
	0,439	15,0	22,7
110°C	0,420	17,0	25,7
	0,422	17,0	25,7
	0,430	16,0	24,2

**Tabela 3:** Influência da concentração de aciclovir no processo

meq/100g arg	Abs. 270nm	meq fix/100g arg	Rendimento de intercalação(%)
66	0,462	12,0	18,2
	0,476	10,0	15,1
	0,439	15,0	22,7
88	0,592	17,8	20,2
	0,517	27,2	30,9
150	0,610	15,5	17,6
	0,110	59,6	39,7
	0,096	77,0	51,3
444	0,115	36,6	24,4
	0,078	171,0	38,5
	0,078	171,0	38,5
888	0,079	176,0	39,6
	0,079	159,0	17,9
	0,072	154,0	28,6
	0,070	278,0	31,3



**Figura 1:** Difratograma da intercalação argila sódica aciclovir em comparação à bentonita sódica isolada.

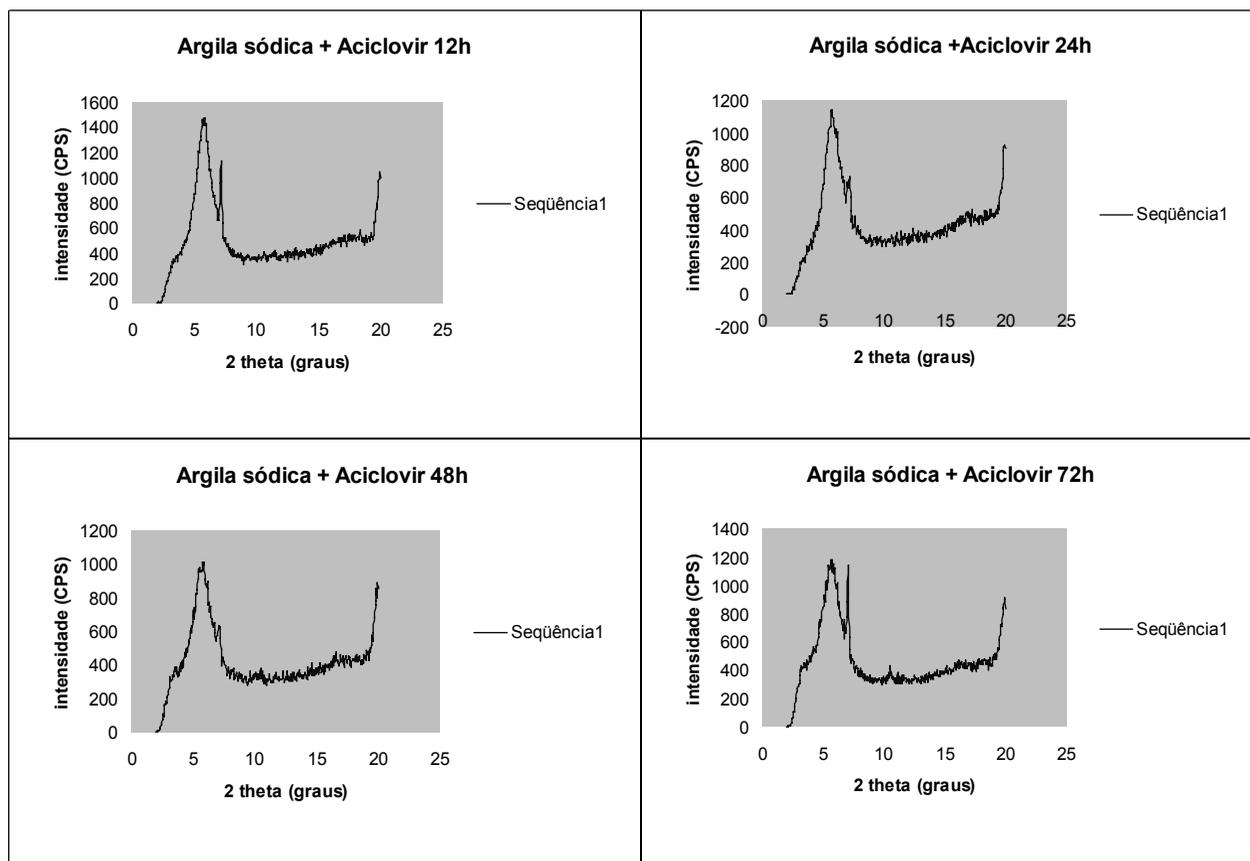


Figura 2: Resultados das reações de intercalação argila sódica aciclovir

Uma redução significativa na quantidade de fármaco intercalada (84 meq fix/100g arg) foi verificada neste caso como consequência da baixa lipofilicidade do mesmo, o que contraria a hipótese inicial de maior afinidade da argila organofílica frente à argila sódica pelo fármaco, visto ser esta muito pouco solúvel em água, sendo o difratograma obtido exibido na Figura 3.

### CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS ACICLOVIR – ARGILA SÓDICA E ACICLOVIR – ARGILA ORGANOFÍLICA ELEITOS

De acordo com os espectros de infravermelho (Figuras 4 e 5), não houve qualquer deslocamento significativo dos sinais observados nos materiais de partida, em ambos os casos, de onde conclui-se que a técnica não se mostra efetiva na elucidação da formação de nanocompósitos.

Sobrepondo-se os resultados da difração de raios X das argilas puras com os materiais intercalados (Figuras 6

e 7), pode-se verificar um aumento do espaçamento basal das argilas nos materiais provindo das reações, o que é ratificado com o cálculo destes aumentos (3,4Å e 10,3Å para argila sódica e organofílica, respectivamente), de acordo com a equação de Bragg (Tabela 4).

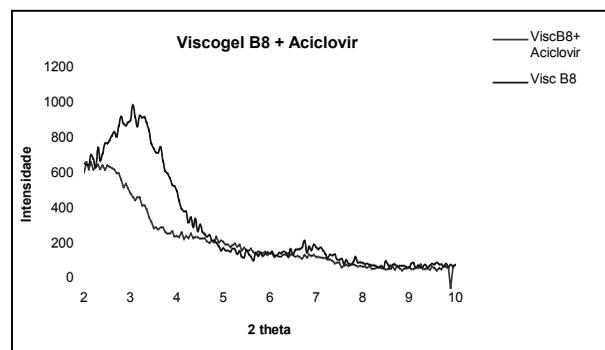


Figura 3: Resultados das reações de intercalação argila sódica aciclovir  
Resultados das reações de intercalação viscogel B8 - aciclovir

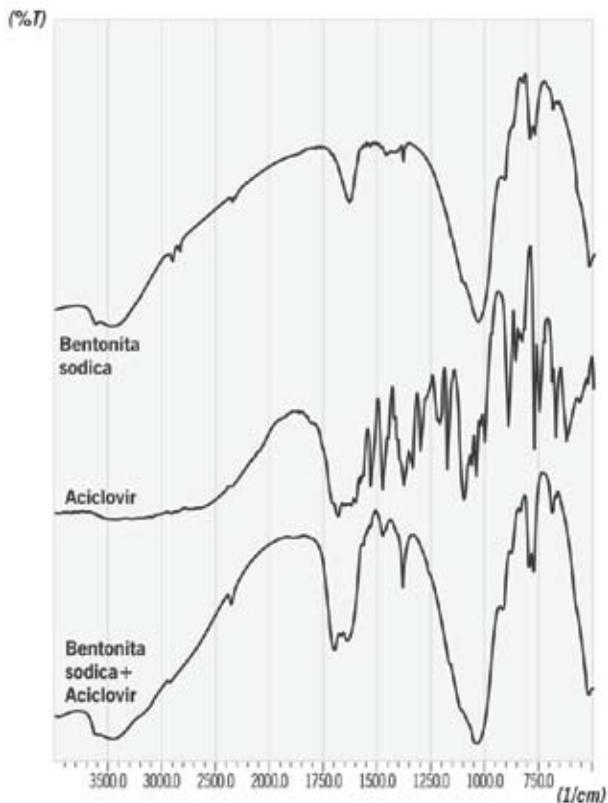


Figura 4: Espectros de infravermelho da bentonita sódica pura, aciclovir e bentonita sódica intercalada com aciclovir

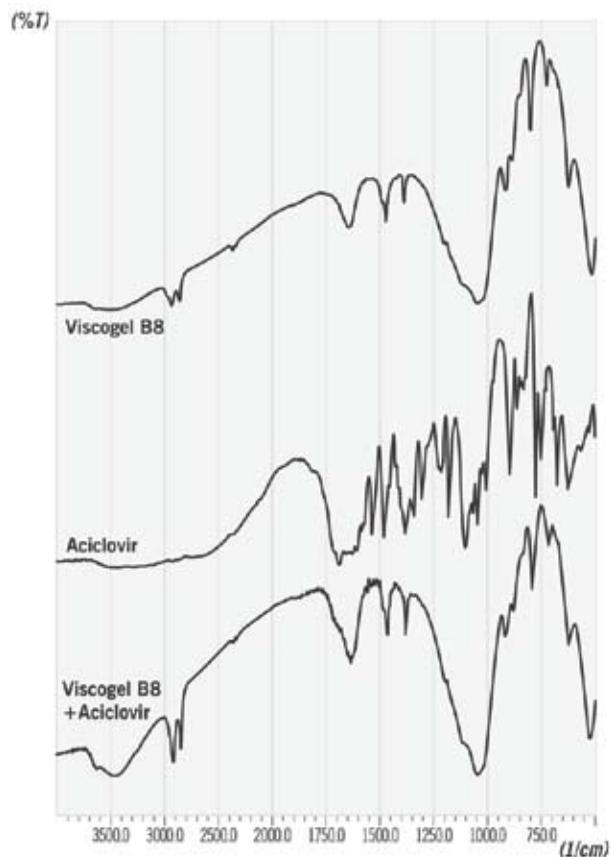


Figura 5: Espectros de infravermelho da bentonita sódica pura, aciclovir e bentonita sódica intercalada com aciclovir

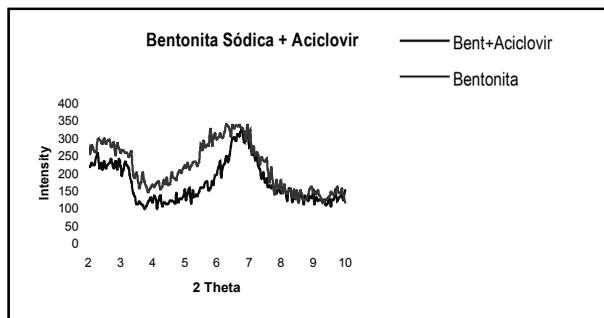


Figura 6: Difratogramas de amostras de bentonita sódica pura e intercalada com aciclovir

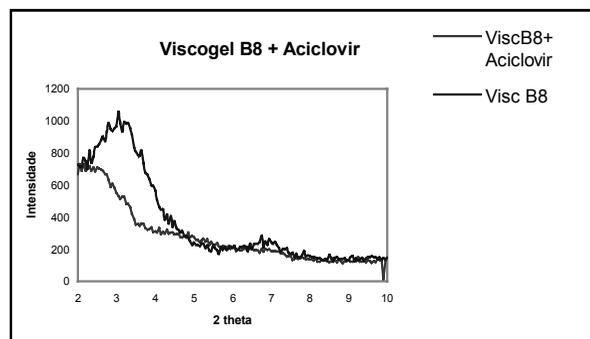


Figura 7: Difratogramas de amostras de viscogel B8® puro e intercalado com aciclovir

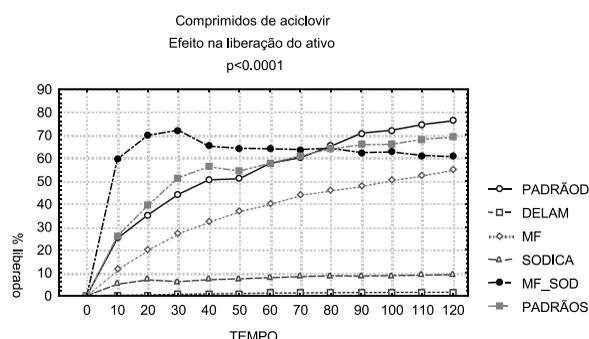
Considerando-se as dimensões moleculares do aciclovir e o espaçamento original das argilas estudadas, pode se concluir que o fármaco se inseriu no interior do espaço interlamelar, originando, provavelmente, um nanocompósito intercalado, possivelmente orientado na forma de uma monocamada.

## ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO

Os estudos de dissolução realizados com os comprimidos oriundos dos nanocompósitos obtidos demonstraram um evidente retardo na dissolução do aciclovir, com as duas argilas consideradas, como pode ser observado pela Figura 8.

Quando o aciclovir foi intercalado com a bentonita organofílica, apenas 2% do aciclovir contido na formulação foi liberado para o meio de dissolução, ao passo que uma quantidade próxima a 70% é liberada na ausência de bentonita. A mistura física destes componentes também promoveu o retardo da liberação do ativo, porém de forma menos eficiente do que quando o ativo foi intercalado (56% versus 2% de aciclovir liberado, respectivamente).

A intercalação do ativo com a bentonita sódica também retardou eficientemente a liberação do fármaco para o meio de dissolução, promovendo a liberação de apenas 10% do ativo durante todo o ensaio. A mistura física destes componentes também gerou um retardo na liberação de aciclovir, porém tênue quando comparada à formulação contendo o nanocompósito (62% versus 10%, respectivamente).



**Figura 8:** Efeito da bentonita sódica e delaminada na liberação do aciclovir

## Conclusões

Pelos resultados obtidos, mostra-se evidenciada a possibilidade de formular aciclovir em sistemas de liberação modificada, como carreadores nanométricos derivados de silicatos lamelares. O viscogel B8® se mostrou bastante eficaz em retardar a dissolução do ativo testado, o que se deve, possivelmente, ao caráter lipofílico inerente a esse material, apontando o uso desta argila como uma nova matriz para liberação prolongada de fármacos.

Estudos de estabilidade subseqüentes deverão ser realizados para se obter novos medicamentos com base nos sistemas aqui desenvolvidos.

**Tabela 4:** Valores de espaçamento basal ( $d_{001}$ ) e variação do espaçamento basal ( $\Delta d_{001}$ ) dos nanocompósitos obtidos

Amostra	$d_{001}$	$\Delta d_{001}$
Bentonita Sódica	9,5Å	-
Viscogel B8®	28,95Å	-
Bentonita Sódica + Aciclovir	12,9Å	3,4Å
Viscogel B8® + Aciclovir	39,25Å	10,3Å

## REFERÊNCIAS

1. Afshar, M.; Prescott, C.D.; Varani, G.; *Current Opinion in Biotechnology* **2001**, 10 (1), 59.
2. Lockhart, D. J.; Ho, M. H.; Wodicka, L.; *European Patent Application* **2004**, 418, 244.
3. Albuquerque, U. P.; Hanazaki, N.; *Rev. bras. farmacogn.* **2006**, 16, 678-689.
4. Hardman J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G.; *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th ed., **2007**.
5. Duran, N., De Azevedo, M.M.M.; Rede de Nanobiotecnologia. UNICAMP, www.comciencia.br, acessado em 01/04/2008.

6. Farrel, S. Hesketh, R. P. An introduction to drug delivery for Chemical Engineers. em<<http://engineering.eng.rowan.edu/~hesketh/hesketh/cee%20drug%20delivery.pdf>> Companies involved in polymeric drug delivery.htm> Acessado em 01/03/2008.
7. Lupi, O.; *An. Bras. Dermatol.* **2000**, 75(3), 261-275.
8. Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R.; *Química Nova* **2003**, 26 (5).
9. Schaffazick, S.R.; Pohlmann, A.R.; Dalla-Costa, T.; Guterres S.S.; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2003**, 56 (3), 501-505.
10. Prista, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R.; *Tecnologia Farmacêutica*, 4th ed. Porto: Calouste Gulbenkian, **1995**.
11. Lopes, C.M.; Lobo, J.M.S.; Costa, P.; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**, 41 (2).
12. Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C.; *Pharmacological Reviews* **2001**, 53 (2), 283-318.

---

Flávia Almada do Carmo<sup>1</sup>,  
Lúcio Mendes Cabral\*<sup>1</sup>,  
Camila Braga Dornelas<sup>2</sup> e  
Michele Villardi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Departamento de Medicamentos, Laboratório de Tecnologia Industrial Farmacêutica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

<sup>2</sup>Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

\*E-mail: [lmcabral@pharma.uffj.br](mailto:lmcabral@pharma.uffj.br)

# Inovação Tecnológica e Polimorfismo de Fármacos

Carlito Lariucci, Hamilton B. Napolitano e Silvio Cunha

O conhecimento do tipo de polimorfismo que um fármaco apresenta e das diferenças estruturais entre esses polimorfos é importante na pesquisa da indústria farmacêutica, pois a descoberta de um novo polimorfo, mesmo que seja metaestável, mas que possa ser produzido de forma controlada por uma empresa farmacêutica concorrente, constitui uma ameaça à patente de uma empresa sobre o seu princípio ativo. Nesse trabalho apresenta-se a importância dos métodos cristalográficos na análise de fármacos e suas aplicações na obtenção das informações estruturais precisas na identificação e caracterização de polimorfos, tais como: *parâmetros da cela unitária, conformação molecular, empacotamento molecular e ligações de hidrogênio.*

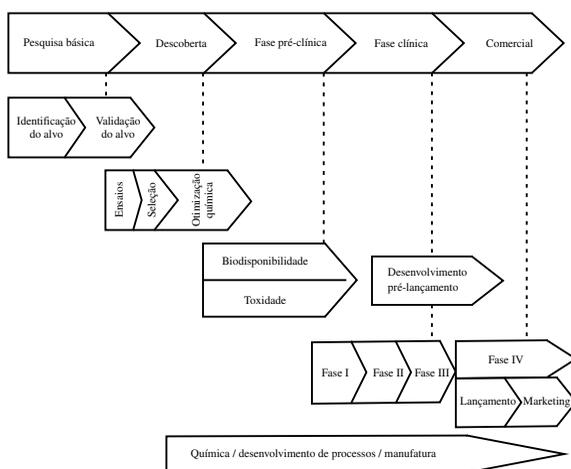
**Palavras-chave:** *polimorfismo; cristalografia.*

The knowledge of the polymorphism present in the specific drug and structural differences between these polymorphs are meaningful informations. The new polymorph discovered by another company yielded in controlled way becomes a kind of threat to the patent of active molecule. In this work we present the importance of crystallographic method to analyze the pharmaceutical molecules and its application aiming to obtain the most valuable structural information in the identification and characterization of the polymorphous: *unit cell parameters, molecular conformation, molecular packing and hydrogen bonds.*

**Keywords:** *polymorphism; crystallography.*

## Introdução

A *inovação tecnológica* é um componente principal no desenvolvimento da indústria farmacêutica, e requer metas de produtividade e elevados níveis de investimento em Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação (PD&I)<sup>1,2</sup>. Uma vez identificado um alvo biológico promissor envolvido em um estado de doença humana, o processo de descoberta de novas moléculas bioativas com potencial terapêutico poderá ser iniciado. Nesse momento, se dará a decisão por parte da companhia farmacêutica sobre o investimento de milhões de dólares neste longo processo, que passará, impreterivelmente, pelas fases complexas de descoberta e desenvolvimento. Um esquema geral das etapas envolvidas em PD&I de fármacos é apresentado na Figura 1.



**Figura 1:** Etapas envolvidas no processo de PD&I de fármacos.

O planejamento de novos agentes terapêuticos passa essencialmente pela capacidade de identificar moléculas pequenas capazes de interagir de forma seletiva à atividade do alvo macromolecular em um caminho que forneça eficácia e segurança no tratamento da doença de interesse. Fatores como toxidez, especificidade e o desafio de produzir compostos potentes e seletivos, fazem das proteínas o alvo da maioria dos fármacos. As principais companhias farmacêuticas têm investido em novas tecnologias para a descoberta de fármacos, procurando a

integração das diversas áreas do conhecimento envolvidas neste processo de caráter multidisciplinar. Dentro deste complexo paradigma, destaca-se o crescimento do emprego de técnicas computacionais avançadas associadas ao tradicional trabalho experimental de laboratório. As plataformas para inovação são muitas e englobam diversos componentes das pesquisas clínicas em suas diferentes fases de desenvolvimento, associados a inúmeros outros componentes da pesquisa básica, que envolvem desde a validação de alvos moleculares até a descoberta e desenvolvimento de *New Chemical Entities* (NCEs) candidatas a novos fármacos<sup>1,2</sup>.

Os NCEs podem existir em diferentes formas com diferentes propriedades físicas e químicas e, quando encontrado no estado sólido, existem em mais de uma estrutura cristalina. O polimorfismo é uma propriedade importante e inclui todas as formas sólidas de uma mesma molécula (que apresentem a mesma fase de vapor, líquida ou em solução). O fenômeno do polimorfismo representa um desafio na indústria farmacêutica que pretende desenvolver drogas de qualidade consistente. Determinar a estrutura cristalina de um NCE é uma das primeiras etapas do desenvolvimento farmacêutico, e a verificação da existência de polimorfos deve ocorrer antes dos estudos clínicos e dos testes de estabilidade, pois a estrutura cristalina de uma droga possibilita (a) verificar quão facilmente ela pode ser formulada, (b) verificar a aplicação biológica e (c) informar a respeito de sua estabilidade. Diferenças na forma cristalina podem causar variações de propriedades físico-químicas dos compostos e, em consequência, diferentes formulações, biodisponibilidade e estabilidade.

O conhecimento dos polimorfos de um cristal é estratégico para a indústria farmacêutica, pois já houve casos de prejuízos em empresas depois de se observar mudanças nas formas polimorfas, que no final resultaram em qualidade inferior no teste de estabilidade do produto final, como, por exemplo, o medicamento *Norvir*<sup>®</sup>, de cápsulas semi-sólidas de *Ritonavir*. Em 1998, a *Abbott Laboratories* teve que reformular a droga anti-HIV *Ritonavir* quando os processos de manufatura repentinamente começaram a produzir um polimorfo mais estável<sup>2</sup>. A descoberta de um novo polimorfo, mesmo que seja metaestável, mas que possa ser produzido de forma controlada por uma empresa farmacêutica concorrente,

é uma ameaça à patente de uma empresa sobre o seu princípio ativo.

Uma vez descoberta uma nova droga, normalmente é a forma cristalina que é patenteada. Os polimorfos podem causar problemas, como: (a) um competidor poderia patentear e comercializar um polimorfo diferente; (b) um polimorfo indesejado (e potencialmente tóxico ou inerte) poderia ser manufaturado; (c) diferentes condições de manufatura ou condições de formulação podem produzir diferentes polimorfos; (d) é muito difícil determinar todos os possíveis polimorfos por experimentação; (e) podem ter propriedades inteiramente diferentes a partir da formulação desejada padrão, dentre outros.

Após a obtenção de uma nova formulação farmacêutica, várias perguntas precisam ser respondidas antes da comercialização, dentre elas<sup>3-5</sup>: (1) Que tipo de polimorfismo exibe uma determinada droga? (2) Qual a diferença estrutural entre os polimorfos (empacotamento cristalino, ligações de hidrogênio, conformação molecular)? (3) De que maneira os polimorfos diferem em propriedades que podem afetar a qualidade e o desempenho de drogas (estabilidade, solubilidade, higroscopicidade, entre outros)? (4) As propriedades físicas podem ser previstas a partir da estrutura e vice-versa?

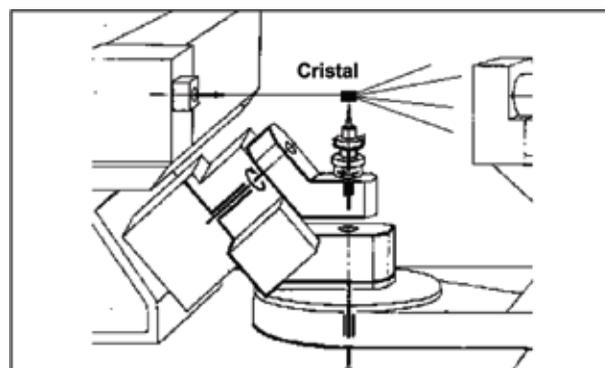
A Cristalografia de monocristais<sup>3,4</sup>, por difração de raios X<sup>5,7</sup>, conforme ilustrado na Figura 2, fornece as mais precisas informações estruturais de compostos cristalinos, tais como: parâmetros da cela unitária; densidade; desordem cristalina; conformação molecular; empacotamento molecular; ligações de hidrogênio. O método cristalográfico fornece o conhecimento da disposição tridimensional dos átomos da estrutura molecular para compostos no estado cristalino. É uma metodologia interdisciplinar, com contribuições relevantes à Biologia Estrutural, Física, Química e a Tecnologia Farmacêutica.

O polimorfo pode ser identificado através da função matemática denominada *densidade eletrônica*<sup>6,7</sup>  $\rho(\mathbf{r})$ , construída através dos métodos cristalográficos, dado pela expressão

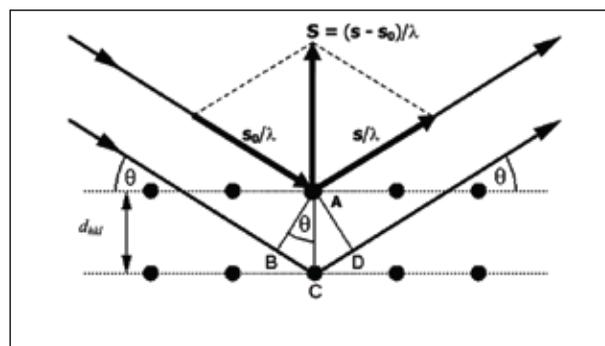
$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} F(\mathbf{h}) \exp i[-2\pi \mathbf{h} \cdot \mathbf{r}] = \frac{1}{V} \sum_{\mathbf{h}} |F(\mathbf{h})| \exp i[-2\pi \mathbf{h} \cdot \mathbf{r} + \phi(\mathbf{h})] \quad (1)$$

onde  $V$  é o volume da cela unitária e  $F(\mathbf{h})$  é o fator de estrutura na forma complexa, sendo seu módulo ao quadrado

$|F(\mathbf{h})|^2$  proporcional à intensidade da reflexão medida para direção  $\mathbf{h}$ . A quantidade  $\mathbf{h} \cdot \mathbf{r}$  corresponde ao produto escalar entre o vetor espalhamento no espaço recíproco  $\mathbf{h}$  e o vetor posição no espaço direto  $\mathbf{r}$ . O conhecimento da função  $\rho(\mathbf{r})$  para cada posição  $\mathbf{r}$  da cela unitária depende ainda do conhecimento das fases  $\phi(\mathbf{h})$ . Uma vez conhecida a densidade eletrônica  $\rho(\mathbf{r})$ , de forma plena se conhece de maneira unívoca a estrutura do polimorfo.



(a)



(b)

**Figura 2:** (a) Diagrama esquemático para difratômetros de monocristais, utilizados na coleta de dados de difração por raios X. (b) Representação esquemática (fora de escala) da equação de Bragg.  $\theta$  é o ângulo entre o feixe de raios X incidente e o plano difrator  $hkl$ . A diferença de caminho entre as duas ondas espalhadas por A e C é  $BC + CD = 2d_{hkl} \sin \theta$ . A condição de difração é verificada quando a diferença de caminho for um múltiplo inteiro do comprimento de onda  $\lambda$ . O módulo do vetor  $S_{hkl}$  é o inverso da distância interplanar  $d_{hkl}$ .

## Importância do Polimorfismo na Indústria Farmacêutica

Conforme descrito, um dos grandes problemas da indústria farmacêutica, no atual contexto de inovação e competitividade, é o polimorfismo<sup>8</sup>. O cerne do problema reside nas diferentes propriedades físicas e químicas de uma mesma substância em formas diferentes, tais como: densidade, índice de refração, ponto de fusão, condutividade elétrica ou térmica, higroscopicidade, energia livre e potencial químico, capacidade calorífica, pressão de vapor, solubilidade, estabilidade térmica, taxa de dissolução, cinética de reação do estado sólido, energia livre de superfície, hábito cristalino, cores, dureza, compressão, reatividade química e fotoquímica. Cabe destacar que todos esses parâmetros influenciam direta ou indiretamente nas pré-formulações farmacêuticas.

As condições de cristalização e produção das amostras podem levar ao surgimento de polimorfos em um grupo de cristais ou substâncias. O que se espera é obter cristais com forma e propriedade conhecidas ou então reproduzir os próprios resultados em laboratório. O mais importante, mas nem sempre alcançado, é conhecer o processo correto para obter os cristais com as características físicas, químicas e mecânicas desejadas, que são governadas por fatores termodinâmicos e cinéticos. Para se ter uma idéia da distinção entre a influência termodinâmica e cinética basta observar o clássico exemplo do *carbono* nas formas de grafite e diamante<sup>8</sup>. A forma cristalina do grafite é termodinamicamente preferida, mas fatores cinéticos, em particular a alta barreira de ativação, fazem com que a taxa de transformação do diamante para grafite seja infinitamente lenta. Contudo, o processo de cristalização pode ocorrer em posições de mínimos de energia metaestáveis ou estáveis. Uma mesma substância pode cristalizar nos dois mínimos de energia, com conformações diferentes em cada uma das posições. Assim teríamos um polimorfismo conformacional com diferença de energia entre eles variando de 1-2 kcal/mol<sup>8</sup>. Este é o caso da N-Benzoil-Guanidina<sup>9</sup>.

Outro tipo de polimorfismo muito comum é a incorporação de molécula(s) de solvente durante o processo de cristalização. Assim, pode-se afirmar que formas diferentes de cristais de uma substância podem

possuir propriedades muito diferentes, além de se comportar como materiais diferentes. Estes conceitos têm implicações importantes nos campos da química associados com a produção e comercialização de moléculas na forma de materiais cristalinos (drogas, pigmentos, aditivo alimentar, explosivos, entre outros). A indústria precisa saber não somente a natureza exata do material no processo de produção e comercialização, mas também sua estabilidade com tempo, a variabilidade de suas propriedades físicas e químicas como uma função da forma cristalina. Em algumas áreas, por exemplo a indústria farmoquímica, a procura e caracterização de formas cristalinas do NCE se tornou um passo primordial para a escolha da melhor forma para formulação, produção, estabilidade e para proteção da propriedade intelectual<sup>2,8</sup>.

## Polimorfos de Potenciais Fármacos

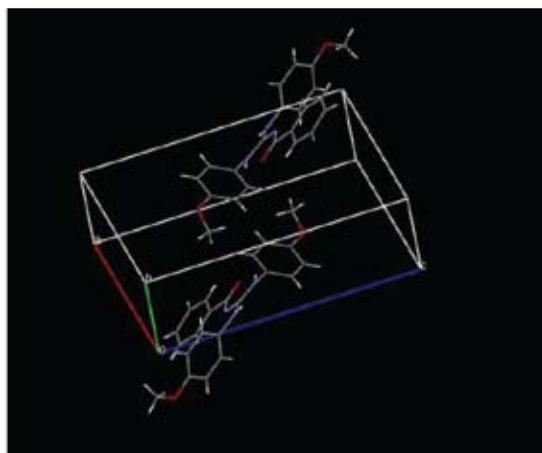
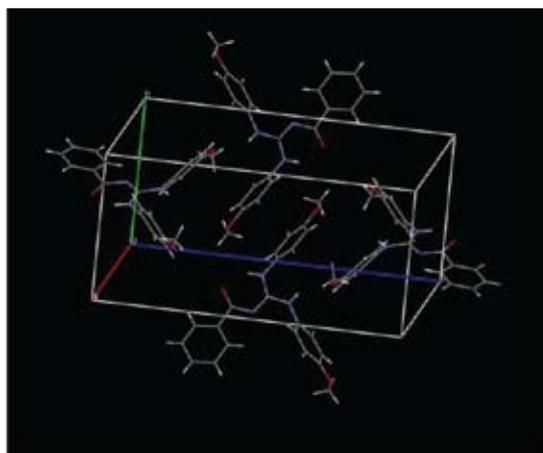
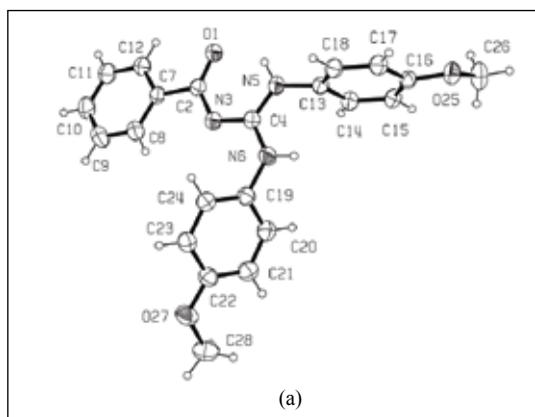
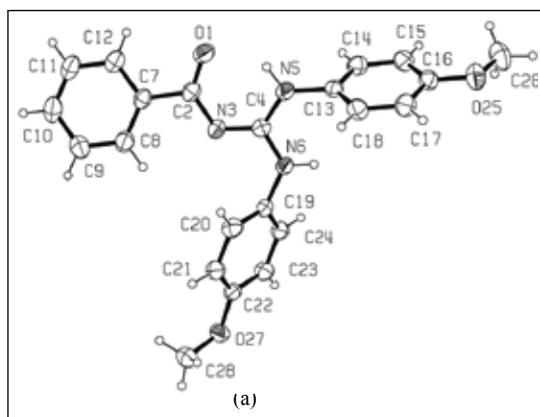
Sistemas polimórficos proporcionam oportunidade únicas para estudar a competição entre forças intermoleculares e correlações entre mudanças na estrutura molecular e o empacotamento cristalino. A síntese de guanidinas é um tema de intensa investigação pelo fato desta classe de composto está presente em uma variedade de substâncias com atividade biológica, tanto naturais quanto sintéticas. A elucidação estrutural tridimensional de guanidinas fornece informações sobre pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, que podem ser úteis na compreensão da atividade biológica desta classe de compostos. Descrevemos aqui o polimorfismo da N-Benzoil-Guanidina: 4-Metoxi-1-[4-metoxianilino(fenilcarbonilimino)metilamino]benzeno<sup>9</sup>, um potencial NCE.

O trabalho de determinação da estrutura tridimensional de ambos polimorfos foi obtido através da cristalografia de raios X, e envolveu as seguintes etapas<sup>10-15</sup>, (1) coleta de dados, (2) processamento dos dados, (3) resolução da estrutura, (4) refinamento e (5) validação e análise do modelo cristalográfico.

O polimorfo (I) é caracterizado estruturalmente através dos parâmetros cristalográficos, como cela unitária monoclinica ( $a = 11,70 \text{ \AA}$ ;  $b = 9,16 \text{ \AA}$ ;  $c = 18,67$

Å;  $\alpha = \gamma = 90^\circ$  e  $\beta = 96,26^\circ$ ), grupo espacial equivalente a simetria  $P2_1/n$  com quatro moléculas dentro da cela unitária ( $Z = 4$ ). A descrição estrutural do forma 1 pode ser vista na Figura 3. O polimorfo (II) é caracterizado estruturalmente através dos parâmetros cristalográficos, como cela unitária monoclinica ( $a = 8,13$  Å;  $b = 8,55$  Å;  $c = 14,76$  Å;  $\alpha = 97,52^\circ$ ,  $\beta = 94,02^\circ$  e  $\gamma = 100,04^\circ$ ), grupo espacial equivalente a simetria  $P-1$  com apenas duas

moléculas dentro da cela unitária ( $Z = 2$ ). A descrição estrutural do forma (II) pode ser vista na Figura 4. Os diferentes arranjos espaciais observados para a acomodação molecular entre os polimorfos I e II implicam em diferentes padrões de interações não-covalentes e, portanto, em diferentes propriedades físico-químicas. A Figura 5 ilustra as diferenças estruturais moleculares entre os polimorfos I e II.



**Figura 3:** (a) Representação da estrutura tridimensional molecular do polimorfo I. (b) Representação da estrutura cristalina do polimorfo I ilustrando a simetria do grupo espacial  $P2_1/n$ .

**Figura 4:** (a) Representação da estrutura tridimensional molecular do polimorfo II. (b) Representação da estrutura cristalina do polimorfo II ilustrando a simetria do grupo espacial  $P-1$ .

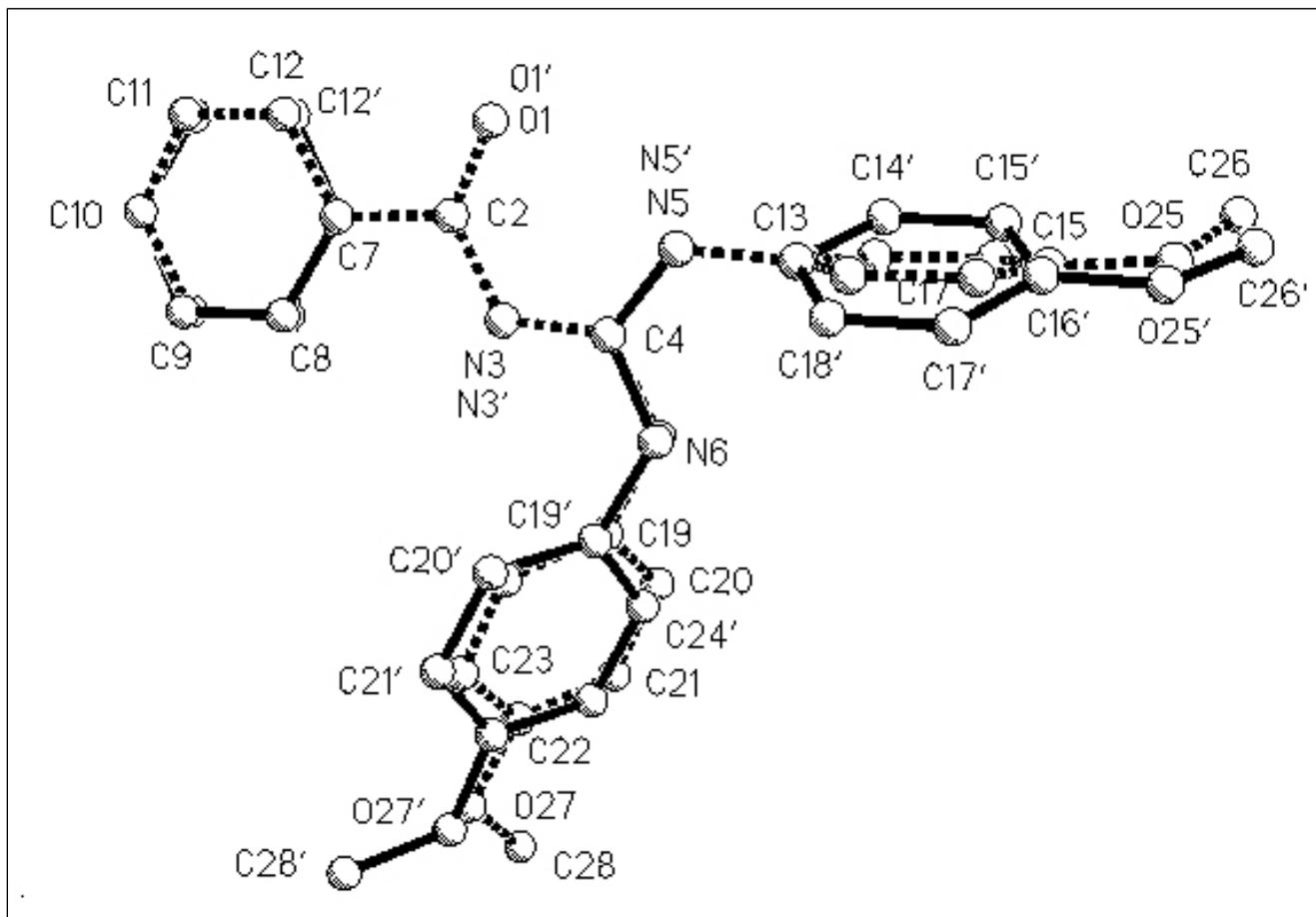


Figura 5: Representação das diferenças estruturais da estrutura tridimensional molecular entre os polimorfos I e II.

## Considerações Finais

O estudo do polimorfismo vem, nas últimas décadas, ganhando grande importância para a indústria farmacêutica<sup>8,16</sup>. A necessidade de seu estudo, sobretudo na pesquisa por novos fármacos e no estudo de *pré-formulações*, fica evidente pelo exemplo discutido. Qualquer NCE pode possuir polimorfismo e não existe uma boa relação *a priori* entre (1) a classe da substância química e (2) a existência de polimorfos. Para tanto, existem diversas técnicas de análise e de manipulação da forma cristalina que tornam possível a obtenção da isoforma que melhor atenda à determinada formulação. A metodologia mais versátil e que se destaca nesta tarefa é a cristalografia de raios X.

## REFERÊNCIAS

1. Yu, L.; Reutzel, S. M. & Stepherson, G. A. *PSTT*, v. 1(3), p. 118, **1998**.
2. Snider, D. A.; Addicks, W & Owens, W. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 391, **2004**.
3. Stout, G. & Jensen, L. H. *X-ray structure determination – A practical guide*, 2a. ed.; The Macmillan Company: London, **1989**.
4. Viterbo, D. Em *Fundamentals of Crystallography*; 2a. ed.; IUCr e Oxford Science Publication: New York, **2002**.

5. Cullity, B. D. *Elements of X-ray diffraction*, 2a. ed.; Addison-Wesley Publishing Company, Inc: Massachusetts, **1978**.
6. Giacovazzo, C. Em *Fundamentals of Crystallography*; IUCr e Oxford Science Publication: New York, **1992**.
7. Giacovazzo, C. *Fundamentals of Crystallography*, 2a. ed.; IUCr e Oxford Science Publication: New York, **2002**.
8. Bernstein, J. *Polymorphism in Molecular Crystals*. Oxford University Press. UK, **2007**; Bernstein, J. *Appl. Phys.* 26 B66-B76, **1993**.
9. Cunha, S., Lariucci, C & Napolitano, H. B. Artigo em preparação da N-Benzoil-Guanidina: 4-Metoxi-1-[4-metoxianilino(fenilcarbonilimino)metilamino]benzeno, incluindo a descrição da Forma I e II. **2008**.
10. Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G. & Spagna, R. *J. Appl. Cryst.*, v.32, p.115, **1999**.
11. Sheldrick, G. M. *SHELXL-97 Program for the Refinement of Crystal Structures*. University of Göttingen. Germany, **1997**.
12. Sheldrick, G. M.; *SHELXS-97 Program for the Solution of Crystal Structures*. University of Göttingen. Germany, **1990**.
13. Beurskens, P. T.; Beurskens, G.; Gelder, R.; Garcia-Granda, S.; Gould, R. O.; Israel, R. & Smits, J. M. M. *The DIRDIF-99 Program System. Crystallography Laboratory*, University of Nijmegen, The Netherlands, **1999**.
14. CSD (Cambridge Structural Database). *Cambridge Crystallographic Data Centre*. 12 Union Road, Cambridge. England, **2000**.
15. Le Page, Y. *J. Appl. Cryst.*, v. 21, p. 983, **1988**.
16. Singhal, D & Curatolo, W. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 335, **2004**.

---

## Carlito Lariucci\*<sup>1</sup>, Hamilton B. Napolitano<sup>2</sup> e Silvio Cunha<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Física, UFG. CP 131, 74001-970, Goiânia, GO.

<sup>2</sup>Ciências Exatas & Tecnológicas, UEG. BR 153, Km 98, 75133-050 Anápolis, GO.

<sup>3</sup>Instituto de Química, UFBA. Campus de Ondina, 40170-290 Salvador, BA.

\*E-mail: lariucci@if.ufg.br

# Base de Dados de Propriedades Farmacocinéticas: uma Contribuição Fundamental na Pesquisa de Novos Fármacos

Tiago L. Moda e Adriano D. Andricopulo

Os desafios enfrentados pela indústria farmacêutica são enormes em todas as etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Um medicamento para uso em humanos deve apresentar um balanço ideal de eficácia e segurança, bem como de suas propriedades farmacocinéticas. A primeira base de dados brasileira para o estudo de propriedades farmacocinéticas foi lançada recentemente na Universidade de São Paulo, sendo batizada de PK/DB. As informações sobre mais de 1,2 mil fármacos são disponíveis na base PK/DB, incluindo mais de 2,9 mil medidas de várias propriedades farmacocinéticas. PK/DB possui acesso livre e rápido, incluindo também uma ferramenta integrada de predição *in silico* de propriedades farmacocinéticas e fisico-químicas. PK/DB é uma contribuição 100% nacional, representando notável inovação tecnológica na área de P&D de fármacos.

**Palavras-chave:** *propriedades farmacocinéticas; base de dados; fármaco.*

The challenges facing the pharmaceutical industry are tremendous at every step of the drug discovery and development process. A drug intended for use in humans should have an ideal balance of efficacy and safety, as well as good pharmacokinetic properties. PK/DB, a comprehensive, web-based and freely available database incorporates high quality data of drug-like and lead-like molecules for a variety of pharmacokinetic and physicochemical properties, including five models for *in silico* ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) prediction. PK/DB is a major Brazilian initiative in the drug discovery area.

**Keywords:** *pharmacokinetic properties; database; drug discovery.*

## Introdução

A indústria farmacêutica vem passando por importantes transformações decorrentes sobretudo dos notáveis avanços científicos e tecnológicos fundamentados em novos paradigmas de natureza intrinsecamente multidisciplinar. A descoberta de novos fármacos de diversas classes terapêuticas tem proporcionado melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações no mundo.<sup>1,2</sup> O papel relevante da química medicinal nos processos inovativos da gênese planejada de fármacos é preservado ao longo dos anos nas várias interfaces e conexões entre a química e a biologia. Em particular, os métodos em quimio- e bioinformática têm sido amplamente empregados no processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos, encontrando grande aplicação em suas etapas iniciais, incluindo a identificação, seleção e otimização de moléculas bioativas candidatas a novas entidades químicas (NCEs, do inglês, *New Chemical Entities*).<sup>3</sup> A integração de métodos computacionais avançados ao trabalho químico e biológico experimental é essencial para a geração de novas moléculas bioativas qualificadas acerca de uma série complexa de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas.<sup>4,5</sup>

O processo de descoberta e desenvolvimento de NCEs é longo, complexo e envolve altos investimentos.<sup>6</sup> Desde a concepção até a introdução de um único fármaco no mercado farmacêutico, são estimados entre 12 e 15 anos em P&D, com investimentos totais da ordem de US\$ 500-880 milhões, podendo alcançar, em alguns casos, cifras superiores a US\$ 1 bilhão.<sup>7-12</sup>

Embora a indústria farmacêutica ocupe um lugar de destaque nos segmentos mais rentáveis do mercado mundial, o número de novos fármacos lançados no mercado diminuiu sensivelmente na última década.<sup>13-16</sup> Para alcançar as exigências de produtividade impostas pelos elevados níveis de investimentos em P&D de fármacos, as maiores companhias farmacêuticas do mundo têm adotado como uma de suas estratégias principais o investimento em novas tecnologias para a descoberta de fármacos.

A química combinatória e as triagens biológicas automatizadas em larga escala (HTS, do inglês, *High-Throughput Screening*) têm proporcionado grandes

oportunidades para a descoberta de moléculas bioativas com excelentes propriedades farmacodinâmicas.<sup>17,18</sup> Entretanto, um dos maiores problemas enfrentados nas fases de pesquisa clínica está associado à falta de propriedades farmacocinéticas apropriadas destas moléculas para o desenvolvimento de um novo medicamento. É importante salientar que a fase farmacodinâmica se refere às interações fármaco-receptor responsáveis pelos efeitos farmacológicos dos fármacos, ao passo que a fase farmacocinética se refere ao caminho que um fármaco faz no organismo, englobando processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (do acrônimo ADME). A ação terapêutica dos medicamentos somente é possível pela associação efetiva das fases farmacodinâmica e farmacocinética.

No esquema moderno de P&D de fármacos apresentado na Figura 1, os métodos computacionais avançados têm surgido como ferramentas de notável importância no estudo de propriedades farmacocinéticas. Diversos modelos *in silico* (desenvolvidos em computador), com diferentes níveis de complexidade e capacidade de processamento, têm sido gerados como alternativas úteis frente aos procedimentos experimentais tradicionais (e.g. PAMPA, Caco-2, MDCK, IAM, HDM).<sup>19,20</sup> A automação, rapidez e menor custo são algumas das vantagens dos métodos *in silico*. Estima-se que os investimentos em tecnologias *in silico* crescerão em torno de 20% até o ano de 2016 e a farmacocinética faz parte destas estimativas.<sup>21,22</sup>

Embora os estudos de propriedades farmacocinéticas sejam essenciais em P&D de fármacos, os pesquisadores que se dedicam a essas atividades, tanto na academia quanto nas indústrias farmacêuticas, encontram grande dificuldade, pois há pouca disponibilidade de dados padronizados. Com o objetivo de disponibilizar informações farmacocinéticas a comunidade científica brasileira e mundial, a primeira base de dados brasileira para o estudo de propriedades farmacocinéticas, batizada de PK/DB (*Database for Pharmacokinetic Properties*), foi lançada recentemente por nosso grupo no Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP). A base PK/DB (<http://www.pkdb.ifsc.usp.br>) incorpora dados de alta qualidade de

propriedades farmacocinéticas e físico-químicas de fármacos com elevada diversidade química, pertencendo a várias classes terapêuticas distintas.

## Base de Dados PK/DB

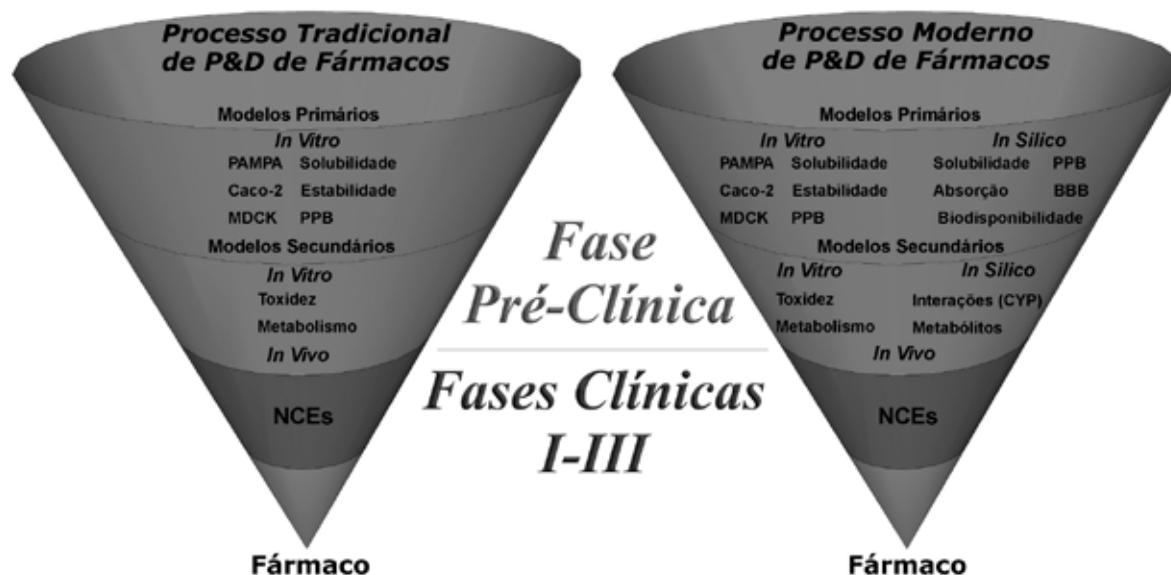
### CARACTERIZAÇÃO

Os dados de propriedades farmacocinéticas e físico-químicas foram coletados da literatura e de base de dados públicas ([http://www.pkdb.ifsc.usp.br/pkdb/literature\\_src.php](http://www.pkdb.ifsc.usp.br/pkdb/literature_src.php)), resultando em mais de 1,2 mil fármacos e 2,9 mil valores de propriedades. Os compostos da base são identificados por sua estrutura, fórmula molecular, peso molecular, SMILES, ação farmacológica e propriedades farmacocinéticas. PK/DB também possui um módulo de predição de propriedades de ADME, o qual permite aos usuários submeter seus compostos de interesse para avaliação de propriedades como absorção intestinal humana, biodisponibilidade oral humana, ligação às proteínas plasmáticas, permeabilidade da barreira hemato-encefálica e solubilidade em água.

### PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS DA BASE PK/DB

**Absorção Intestinal Humana.** A absorção intestinal humana (HIA, do inglês, *Human Intestinal Absorption*) é uma propriedade fundamental para que os medicamentos administrados por via oral possam atingir a corrente sanguínea (via sistêmica) dos pacientes em concentrações necessárias para exercer o seu efeito farmacológico.<sup>23</sup> Os valores de HIA presentes na base PK/DB são referentes à percentagem da dose administrada por via oral que alcança a veia porta (Tabela 1).

**Biodisponibilidade Oral Humana.** A biodisponibilidade oral (F) é uma das propriedades farmacocinéticas mais importantes dos fármacos administrados por via oral. É expressa como o valor percentual da dose administrada por via oral que atinge a circulação sistêmica e torna-se disponível na periferia do sítio alvo de ação.<sup>19</sup> A indústria farmacêutica tem como foco absoluto o desenvolvimento de NCEs que possam ser administradas por via oral.<sup>24</sup> PK/DB apresenta centenas de valores de biodisponibilidade associados às estruturas químicas dos fármacos correspondentes (Tabela 1).



**Figura 1:** Esquema da transição do processo de pesquisa tradicional para o processo moderno de P&D de fármacos. A introdução de métodos *in silico* para o estudo de propriedades farmacocinéticas é uma etapa marcante desta transição.

**Tabela 1:** Números de valores de propriedades presentes na base PK/DB

Sigla	Propriedade	Valores
HIA	Absorção Intestinal Humana	677
F	Biodisponibilidade Oral Humana	660
PPB	Ligação às Proteínas Plasmáticas	440
BBB	Permeabilidade da Barreira Hemato-Encefálica	200
Vd	Volume de Distribuição	291
Cl	Eliminação Renal	360
T1/2	Meia-Vida	355

**Ligação às Proteínas Plasmáticas.** Após serem absorvidos, os fármacos alcançam a circulação sistêmica e são rapidamente distribuídos em função da alta diferença de concentração entre sítio de absorção, sangue e tecidos. Porém, a distribuição ocorre de forma desuniforme nos diferentes tecidos. A ligação às proteínas plasmáticas (PPP, do inglês, *Plasma Protein Binding*) exerce um papel central na ação dos medicamentos, afetando diretamente a distribuição dos fármacos livres nos vários tecidos do corpo humano.<sup>20</sup> Os valores presentes na base PK/DB (Tabela 1) são relacionados à percentagem de fármaco ligado às proteínas do plasma humano.

**Barreira Hemato-Encefálica.** Outra propriedade importante em P&D de fármacos é a permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BBB, do inglês, *Blood Brain Barrier*), onde células endoteliais firmemente unidas formam uma barreira de transporte para certas substâncias químicas entre os capilares cerebrais e o tecido cerebral.<sup>22</sup> Essa propriedade tem fundamental importância para os fármacos que atuam no tratamento de doenças do sistema nervoso central (SNC), como epilepsia, mal de Alzheimer, esquizofrenia e tumores cerebrais. Por outro lado, fármacos que não atuam no SNC devem apresentar limitada capacidade de transpor a BBB, minimizando assim, possíveis efeitos adversos.<sup>25</sup> A Tabela 1 apresenta o número de compostos presentes na base PK/DB com valores disponíveis de logBB (logaritmo do valor de BBB).

**Volume de Distribuição, Eliminação Renal e Meia-Vida.** O volume de distribuição (Vd), a eliminação renal (Cl) e a meia-vida (T1/2) são importantes propriedades

que afetam sensivelmente a ação farmacológica das substâncias bioativas e estão diretamente relacionadas com forma de administração dos medicamentos.<sup>21</sup> Vd é usado para quantificar a distribuição do fármaco no corpo humano. PK/DB possui 291 valores de Vd (Tabela 1). A Cl é expressa como a percentagem de fármaco absorvido que é eliminada através dos rins e excretada pela urina. PK/DB contém diversos valores de Cl associados a diferentes estruturas químicas (Tabela 1). A meia-vida (T1/2) se refere ao tempo necessário para que a concentração plasmática de determinado fármaco seja reduzida pela metade. PK/DB apresenta mais de 300 valores de T1/2 (Tabela 1).

## ESTRUTURA E APLICAÇÕES

PK/DB permite a busca de compostos por estrutura química, subestrutura, nome e fórmula molecular, bem como a busca por valor da propriedade farmacocinética específica ou por faixas de valores de propriedades. A informação sobre a isoforma CYP responsável pelo metabolismo de diversos fármacos também é disponível. Os usuários podem ainda empregar uma combinação de diversos critérios (<http://www.pkdb.ifsc.usp.br/manual.pdf>) na busca de informações específicas. Para facilitar a análise, os resultados são mostrados em duas fases distintas. Na primeira fase, o usuário pode escolher o número de compostos a ser exibido no cabeçalho da seção Search e o resultado inicial pode ser organizado de acordo com vários parâmetros da base. A coluna de resultados da primeira fase apresenta a identificação PK/DB (MID), estrutura 2D, nome padrão dos

compostos, SMILES, peso molecular e propriedades farmacocinéticas como mostrado na Figura 2. A segunda fase possibilita ao usuário, através de uma ligação (do inglês, *link*) direta no nome dos compostos, acesso a informações detalhadas da base como estrutura 3D, propriedades farmacocinéticas, propriedades físico-químicas e ação farmacológica.

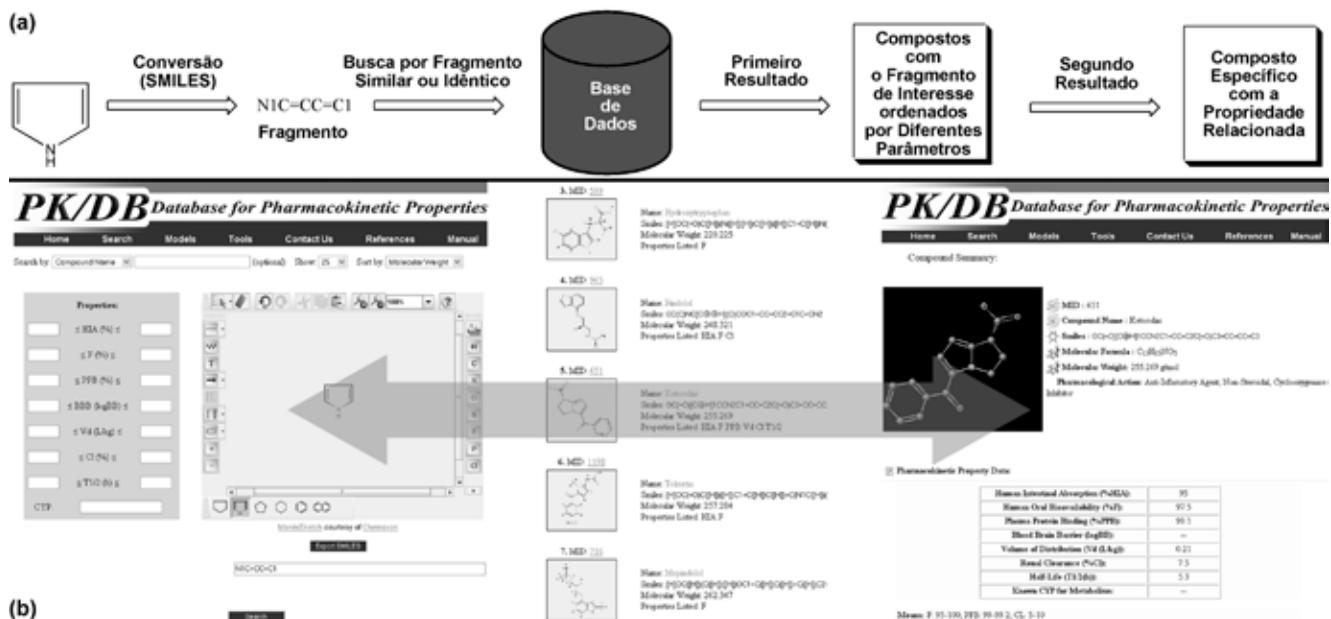
### PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS

A base PK/DB integra cinco modelos *in silico* para a avaliação de propriedades farmacocinéticas e físico-químicas, incluindo biodisponibilidade oral humana, ligação às proteínas plasmáticas, absorção intestinal humana, permeabilidade da barreira hemato-encefálica e solubilidade em água. Os modelos apresentam elevada consistência interna e externa e foram desenvolvidos em nossos laboratórios empregando uma técnica de fragmentos moleculares especializados.<sup>19,20</sup> Pesquisadores do Brasil e de todo mundo podem

testar suas moléculas em fase de desenvolvimento nos modelos da base PK/DB.

## Conclusões

As propriedades farmacocinéticas têm recebido grande atenção da indústria farmacêutica mundial, especialmente nas duas últimas décadas. Devido à importância dos processos de ADME durante os estágios iniciais de P&D de fármacos, avanços significativos vêm sendo realizados no desenvolvimento de novas metodologias nos campos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. A base de dados PK/DB representa notável inovação tecnológica, uma contribuição de grande importância para a ciência brasileira na área de P&D de fármacos. PD/DB é uma base de dados de acesso livre, contando com uma série de funcionalidades que podem ser acessadas em tempo real, de forma simples, rápida e eficaz, basta que o usuário tenha um computador comum e acesso a internet.



**Figura 2:** PK/DB é a primeira base de dados de propriedades farmacocinéticas brasileira. (a) Uma visão geral da arquitetura do sistema da base PK/DB. (b) Esquema ilustrativo das etapas de busca e análise de resultados.

## REFERÊNCIAS

1. Caprino, L.; Russo, P.; *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 999.
2. Yago, G.; Amram, M.; Magula, T.; *Drug Discov. Dev.* **2006**, *12*, 22.
3. Guido, R. V. C.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D.; *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 37.
4. Jónsdóttir, S. Ó.; Jorgensen, F. S.; Brunak, S.; *Bioinformatics* **2005**, *21*, 2145.
5. Andricopulo, A. D.; Montanari, C. A.; *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 585.
6. Berndt, E. R.; Gottschalk, A. H. B.; Philipson, T. J.; Strobeck, M. W.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 545.
7. DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G.; *J. Health Econ.* **2003**, *22*, 151.
8. Lombardino, J. G.; Lowe III, J. A.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 853.
9. Boston Consulting Group. A revolution in R&D: how genomics and genetics are transforming the biopharmaceutical industry. (Boston, Massachusetts, **2001**, [http://www.bcg.com/publications/files/eng\\_genomicsgenetics\\_rep\\_11\\_01.pdf](http://www.bcg.com/publications/files/eng_genomicsgenetics_rep_11_01.pdf))
10. Netterwald, J.; *Drug. Discov. Dev.* **2006**, *12*, 17.
11. Couzin, J.; *Science* **2005**, *309*, 728.
12. Fee, R.; *Drug Discov. Dev.* **2007**, *3*, 32.
13. Avorn, J.; *Science* **2005**, *309*, 669.
14. McGee, P.; *Drug Discov. Dev.* **2006**, *9*, 16.
15. Hoag, H.; *Nature* **2006**, *440*, 1084.
16. Mervis, J.; *Science* **2005**, *309*, 721.
17. Emilsson, V.; *Nature* **2008**, *452*, 423.
18. Shaffer, C.; *Drug Discov. Dev.* **2008**, *5*, 36.
19. Moda, T. L.; Montanari, C. A.; Andricopulo, A. D.; *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7738.
20. Moda, T. L.; Montanari, C. A.; Andricopulo, A. D.; *Lett. Drug. Des. Discov.* **2007**, *4*, 502.
21. van de Waterbeemd, H.; Gifford, E.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 192.
22. Cecchelli, R.; Berezowski, V.; Lundquist, S.; Culot, M.; Renftel, M.; Dehouck, M. P.; Fenart, L.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 650.
23. Linnankoski, J.; Ranta, V. P.; Yliperttula, M.; Urtt, A.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, *34*, 129.
24. Leeson, P. D.; Springthorpe, B.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 881.
25. Bryan, J.; *Pharm. J.* **2004**, *273*, 475.

---

## Tiago L. Moda<sup>1</sup> e Adriano D. Andricopulo<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Química Medicinal e Computacional. Grupo de Cristalografia. Instituto de Física de São Carlos - IFSC/USP, Caixa Postal 369 – Av. Trabalhador São Carlense, 400, CEP: 13560-590 - São Carlos/SP

\*E-mail: [aandrico@ifsc.usp.br](mailto:aandrico@ifsc.usp.br)

# Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana da Ciprofloxacina, Gentamicina e Ceftriaxona

Angelma Genaro e Carlos Alberto de Magalhães Lopes

*E. coli* é a causa mais comum de infecção urinária, sendo responsável por 90%, ou mais, das infecções adquiridas na comunidade, onde sua resistência a diversas drogas tem sido motivo de preocupação das autoridades. O trabalho teve como objetivo comparar a eficácia da ciprofloxacina, ampicilina e ceftriaxona “in vitro” na forma de medicamento de referência e de medicamento genérico. Foram obtidas 79 linhagens provenientes de urina de pacientes com infecção urinária internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de fevereiro a abril de 2004. Foi analisado a suscetibilidade *in vitro* através da Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os resultados demonstraram que a ciprofloxacina e a ceftriaxona não apresentaram diferenças significativas entre os medicamentos genéricos e de referência ao contrário do que foi observado com a ampicilina. Esses dados mostram a eficácia dos medicamentos genéricos quando comparados com os de referência.

**Palavras-chave:** *ciprofloxacina; gentamicina; ceftriaxona; atividade antimicrobiana.*

*E. coli* is considered the main etiological agent in the urinary tract and its resistance to several drugs has been a reason of preoccupation of the authorities. The objective of this work was to compare the antimicrobial commercial drugs effectiveness in its generic and brand mark presentations. 79 strains isolated from patients with urinary infection and interned at the Hospital das Clínicas ( School of Medicine –Botucatu – UNESP), during the period of February to April of 2004. It was *in vitro* analyzed the ceftriaxone, ciprofloxacin and ampicilin susceptibility through determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The results showed that the ciprofloxacin and ceftriaxone generic, as well as the brand mark drugs presented the same effectiveness. In general and according to our observations it is suggestive that the antimicrobial effectiveness of the generic drugs still demand new and wider investigations especially concerning the detections of possible discrepancies with brand mark products of industrial sections showing lower technological development level.

**Keywords:** *ciprofloxacin; gentamicin; ceftriaxone; antimicrobial activity.*

## Introdução

As bactérias da Família *Enterobacteriaceae* constituem um grande grupo heterogêneo de bastonetes Gram negativos, cujo hábitat natural é o trato intestinal de humanos e animais<sup>1</sup>. A família inclui numerosos gêneros e a espécie *E. coli* é constituída por uma variedade relativamente grande de linhagens patogênicas, sendo capaz de causar infecções intestinais, infecções urinárias, sepses, meningites e outros tipos de infecções<sup>2</sup>.

O *microrganismo* é a causa mais comum de infecção urinária, sendo responsável por 90%, ou mais, das infecções adquiridas na comunidade. O tratamento da infecção é realizado através do uso de antibacterianos, porém o uso indiscriminado dessas drogas levou ao aumento na resistência dessas bactérias a vários antimicrobianos<sup>3</sup>. As fluoroquinolonas constituem uma importante classe de drogas para o tratamento de infecções do trato urinário e Isto ocorre, em grande parte, devido a sua excelente atividade contra a *E. coli*.<sup>4,5,6</sup>. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, por sua vez, estão entre os antimicrobianos mais freqüentemente prescritos no mundo todo, constituindo a emergência de resistência a esses agentes, uma decorrência nas duas últimas décadas, da pressão seletiva exercida ao incremento de seu uso terapêutico<sup>7</sup>.

O tratamento das infecções e de outras doenças no âmbito hospitalar e na comunidade gera um custo altíssimo para o governo e para a população e com o objetivo de tornar o tratamento medicamentoso mais acessível a todas as classes sociais, foi legalizado no Brasil o medicamento genérico.

Como determina a lei que regulamenta a comercialização desses medicamentos no Brasil, antes de chegarem ao mercado, os produtos devem passar pelos testes de biodisponibilidade e de bioequivalência para que seja verificado se possuem eficácia igual à do medicamento de marca. Contudo, apesar do avanço das pesquisas na área dos antimicrobianos, ainda não existem na bibliografia informações que comprovem a eficácia dos medicamentos genéricos através de testes *in vitro* em relação à dos medicamentos de marca<sup>8</sup>. Tendo em vista esta problemática, o presente trabalho

teve como objetivo comparar a eficácia da ceftriaxona, ciprofloxacina e ampicilina *in vitro* nas formas de medicamento de marca e de genérico.

## Materiais e Métodos

### LINHAGENS

Foram estudadas 79 amostras de *Escherichia coli* isoladas de amostra de urina, no período de fevereiro a abril de 2004, de pacientes do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu com infecção no trato urinário. As linhagens foram identificadas pelo laboratório de Análises Clínicas do HC e posteriormente transportadas para o laboratório de Microbiologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu-UNESP.

### DROGAS ANTIMICROBIANAS

Droga genérica: Ampicilina (Eurofarma), Cloridrato de Ciprofloxacina (EMS) e Ceftriaxona Sódica (Eurofarma). Droga de marca<sup>®</sup>: Amplacilina (Eurofarma), Cipro (Bayer) e Rocefin (Roche).

### DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A sensibilidade antimicrobiana das linhagens frente a ciprofloxacina, ampicilina e ceftriaxona genérica e de marca<sup>®</sup>, foi avaliada através da Determinação da Concentração Inibitória Mínima, pela diluição da droga em Ágar, conforme as normas estipuladas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS<sup>9</sup> (2004). (Tabela 1).

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente através do teste de Goodman<sup>10,11</sup> (1964,1965) do teste de Norman & Streiner<sup>12</sup> (1999).

### RESULTADOS

Os resultados mostram que a ceftriaxona foi à droga mais efetiva com um perfil de sensibilidade de 93,7% e 92,4% para a droga genérica e de marca

respectivamente, nas 79 linhagens de *Escherichia coli* estudadas. Foi observada a presença de seis linhagens de *E. coli* sensíveis a ampicilina genérica, porém resistentes a ampicilina marca® e uma linhagem sensível a ciprofloxacina de marca®, porém resistente a

ciprofloxacina genérica. (Tabela 2)

Os mais elevados percentuais de perfis de concordância para a sensibilidade das linhagens para ambas as drogas genérica e de marca® foram caracterizados para a ceftriaxona e de resistência para a ampicilina. (Figura 1)

**Tabela 1:** Padronização para a interpretação das Concentrações Inibitórias Mínimas -CIM (µg/mL).

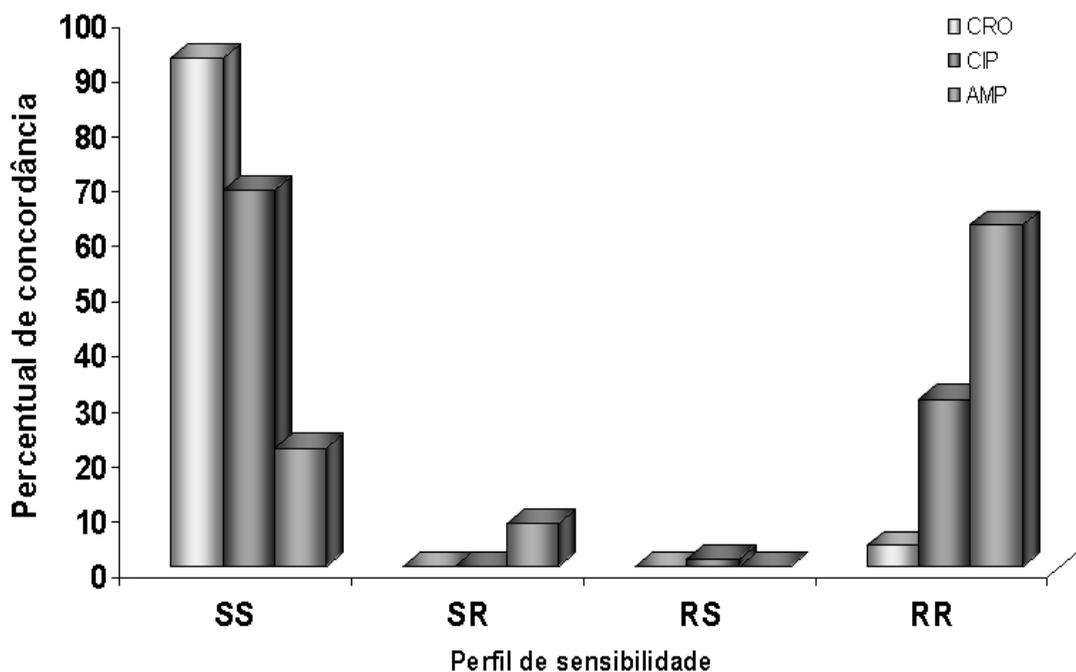
Drogas	Resistente	Sensível	Intermediário*
Ciprofloxacina	≥4	≤1	2
Ceftriaxona	≥64	≤8	16-32
Ampicilina	≥32	≤8	16

Nota:  
National Committee for Clinical laboratory Standards-NCCLS<sup>34</sup> (2004)  
Intermediário\*: fora do padrão de sensibilidade e resistência. As linhagens foram definidas como intermediária de acordo com nosso critério, uma vez que o NCCLS não apresenta esta categoria.

**Tabela 2:** Distribuição percentual das 79 linhagens de *Escherichia coli* segundo os perfis de sensibilidade obtidos para cada droga na forma de medicamento genérico e de marca® em relação ao teste de Determinação da Concentração Inibitória Mínima.

Drogas		S n° (%)	R n° (%)	I n° (%)	Total n° (%)
Ceftriaxona	Genérico	74 (93,7)	3 (3,8)	2 (2,53)	79 (100)
	Marca®	73 (92,4)	5 (6,3)	1 (1,3)	79 (100)
Ciprofloxacina	Genérico	54 (68,4)	25 (31,6)	0 (0,0)	79 (100)
	Marca®	55 (69,6)	24 (30,4)	0 (0,0)	79 (100)
Ampicilina	Genérico	26 (32,9)	49 (62,0)	4 (5,6)	79 (100)
	Marca®	18 (22,8)	57 (72,1)	4 (5,1)	79 (100)

Nota:  
S: sensível; R: resistente; I: intermediário; G: genérico; M: marca; CROG,M: ceftriaxona genérica e de marca; CIPG,M: ciprofloxacina genérica e de marca; AMPG,M: ampicilina genérica e de marca



Nota:

SS: perfil único de sensibilidade para a droga nas formas genérica e de marca.

SR: perfil de sensibilidade e de resistência para a droga nas formas genérica e de marca, respectivamente.

RS: perfil de resistência e sensibilidade para a droga nas formas genérica e de marca, respectivamente.

RR: perfil único de resistência para a droga nas formas genérica e de marca.

CRO: ceftriaxona; CIP: ciprofloxacina; AMP: ampicilina.

**Figura 1:** Distribuição percentual da concordância entre as drogas genérica e de marca®.

## Discussão

Segundo os dados do Ministério da Saúde (MS), dos 170 milhões de brasileiros 50 milhões estão excluídos do acesso aos medicamentos e de qualquer tipo de assistência médica<sup>13</sup>. Os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) são coincidentes, pois se estima que um terço da população mundial também não tenha acesso a medicamentos.

Diante deste contexto, a própria OMS definiu os princípios para as Políticas Nacionais de Medicamentos, visando melhorar o acesso e promover uso racional de medicamentos<sup>14</sup>. Entre as estratégias propostas, os medicamentos genéricos constituem parte essencial, uma vez que representam uma alternativa para assegurar a disponibilidade de medicamentos de qualidade

comprovada e baixo custo<sup>15,16</sup>.

O Brasil seguindo as diretrizes mundiais definiu as bases legais para a instituição do medicamento genérico em 10 de fevereiro de 1999, com a aprovação da Lei nº 9787/99, que ficou conhecida como “Lei dos Genéricos”<sup>17,18</sup>.

Hoje existem 1.700 medicamentos genéricos legalizados no Brasil, mostrando assim o grande crescimento na indústria dos genéricos. Embora sejam realizados testes de equivalência farmacêutica, existem poucos trabalhos científicos a respeito da efetividade dessas drogas. Dentre tanto medicamentos genéricos legalizados no Brasil, vários representam uma classe extremamente importante na terapêutica, uma vez que a utilização de drogas de marca representa um elevado

custo para o Estado e para a população.

Através da análise dos nossos resultados, verifica-se que não houve diferenças significativas entre a ação das drogas em sua forma genérica e de marca. Porém um dado importante a ser considerado é que a análise da sensibilidade antimicrobiana permitiu-nos observar a presença de seis linhagens sensíveis a ampicilina genérica, porém resistentes a ampicilina de marca®. O mesmo foi observado para a ciprofloxacina, onde uma linhagem de *Escherichia coli* apresentou perfil de sensibilidade para a droga marca e resistência para a droga genérica.

Estes resultados, pela sua importância, no que diz respeito à diferença da efetividade da droga na forma genérica e de marca®, demonstra a necessidade de mais estudos para elucidar melhor a qualidade destas drogas. Infelizmente, a ausência de bibliografia especializada não permite uma análise mais apurada dos resultados, o que seria de grande interesse aos clínicos e à comunidade científica. Nossos resultados sobre os percentuais de sensibilidade de linhagens de *Escherichia coli* através da difusão da droga a partir de discos impregnados, permitiram-nos ainda observar a excelente atividade da ceftriaxona (97,5%) e da ciprofloxacina (79, 8%) frente às linhagens estudadas.

Através dos resultados alcançados, consideramos importante ressaltar a necessidade de novas investigações através de outras metodologias e que apesar das drogas na forma de genéricos terem apresentado uma atividade semelhante às de marca®, não podemos esquecer que existem inúmeros genéricos no mercado produzidos por diferentes laboratórios farmacêuticos, onde a qualidade e a eficácia ainda surgem como dúvida para os clínicos e consumidores em função das diferenças de qualidade no processo tecnológico de sua produção.

## Conclusões

Os resultados da sensibilidade antimicrobiana demonstraram um melhor desempenho da ceftriaxona em relação ao da ciprofloxacina e da ampicilina, frente às linhagens de *Escherichia coli*. As drogas genéricas foram tão efetivas quanto as drogas de marca quanto à eficiência antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

- Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H.; *Manual of clinical microbiology*. 6nd ed., Washington: American Society for Microbiology; **1995**.
- Trabulsi, L.R.; Alterthum, F.; Gompertz, O.F.; Candeias, J.A.N.; *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu; **1999**.
- Schor, N. & Srougi, M. *Nefrologia, urologia clínica*. São Paulo: Sarvier; **1998**.
- Graninger, W.; Zedtwitz-Liebenstein, K.; Laferl, H.; Burgmann, H. *Chemotherapy* (Basel). **1996**, 42 (Suppl.1), 43-53.
- Hendersho, E.F.; Fluoroquinolones. *Infect Dis Clin North Am*. **1995**, 9, 715-30.
- Naber, K.G. *J Antimicrob Chemother*. **2000**, 46 (Suppl A), 23-7.
- Goodman, L.S.; Gilman, A.; *As bases farmacológicas da terapêutica*, 9a ed., McGraw Hill: Rio de Janeiro, **1996**.
- Storpiertis, S.; Balduino, J.; Bueno, M.M.; Freitas, S.T.; Gatto, R.C.; Lima, F.P.; et al. *Aspectos técnicos relativos ao registro de medicamento genérico no Brasil*. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; **2003**.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fourteen informational supplement NCCLS*, document M100-S14, Pennsylvania, USA, **2004**.
- Goodman, L.A. *Ann Math Stat*. **1964**, 35, 716-25.
- Goodman, L.A. *Techonometrics*. **1965**, 7, 247-54.
- Norman, G.R.; Streiner, D.L.; *Biostatistics: the bore essentials*. St. Louis: Mosby Year Book; **1994**.
- Brasil. Ministério da Saúde. Informações em saúde. Disponível em: <http://www.saude.gov.br>. Acessado em 14/04/2008.

14. Veiga, F.J.B.; *Política de medicamentos: genéricos ou marca registrada? Experiência da União Européia*. In: Resumos do 9º Congresso da Ordem dos Farmacêuticos Iberolatinos. Salvador. Salvador: OFIL, **2000**.

15. Bermude, J.A.Z. *Cad. Saúde Pública*. **1994**, *10*, 368-78.

16. World Health Organization. Essential drugs and medicines policy. Disponível em: [http://www.who.int/medicines/teams/par/par\\_objectives.html](http://www.who.int/medicines/teams/par/par_objectives.html). Acessado em 10/04/08.

17. Anvisa. Hotside genéricos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotside/genéricos/index.htm>. Acessado em 14/04/08.

18. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei n. 9.787, de 10 de fevereiro de 1999. Estabelece as bases legais para a instituição do medicamento genérico no país. Brasília; **1999**.

---

## Angelma Genaro\*<sup>1</sup>, Carlos Alberto de Magalhães Lopes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Bauru, SP, Brasil. Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biociências - Botucatu.

\*E-mail: [angelmagenaro@hotmail.com](mailto:angelmagenaro@hotmail.com)

# Gestão de Riscos na Indústria Farmacêutica

Wolney Cardoso da Silva

A gestão de riscos consiste no controle de ameaças e oportunidades, objetivando a sobrevivência, o alcance de vantagem competitiva sustentável e o sucesso das organizações, sendo desenvolvida por meio de processos sistemáticos integrados à estrutura, à cultura e às práticas organizacionais, contemplando todos os níveis organizacionais, processos, serviços e produtos. O porte, a complexidade, a importância econômica do setor e, especialmente, a elevada sensibilidade aos riscos têm exigido da indústria farmacêutica a melhoria da qualidade e aumento do rigor dos processos de gestão de riscos e sua extensão a todo o ciclo de vida de seus produtos. Este artigo objetiva a aplicação dos conceitos fundamentais da gestão de riscos no setor produtivo farmacêutico, com foco específico nos riscos relativos ao uso de medicamentos.

**Palavras-chave:** *gestão de riscos; indústria farmacêutica.*

The management of risks is characterized by control of threats and opportunities in order to survive, the scope of sustainable competitive advantage and success of organizations and has been developed through systematic processes to integrated structure, culture and organizational practices, including all levels organizational, processes, services and products. The size, complexity, the economic importance of the sector and especially the highly sensitive to the risks have required the pharmaceutical industry to improve quality and increase the accuracy of procedures for risk management and its extension to the whole life cycle of their products. This article aims to apply the basic concepts of risk management in the pharmaceutical manufacturing sector, with focus on specific risks related to the use of medicines.

**Keywords:** *risk management; pharmaceutical industry.*

## Introdução

O domínio do risco é fator decisivo à sobrevivência e ao sucesso do Homem e das organizações. Das intempéries, animais ferozes e luta pela conquista e manutenção de territórios, típicos dos momentos primitivos, até ao atual ambiente caracterizado pelo desenvolvimento tecnológico e condições de extrema competitividade e volatilidade, ocorreram mudanças notáveis nas características dos riscos e na forma com que o Homem e as organizações têm lidado com eles.

Ao longo da História, o Homem desenvolveu conhecimentos e técnicas para a abordagem racional de uma gama extensa e diversificada de fenômenos, permitindo a identificação, compreensão e tratamento das variáveis, condições e decisões necessárias ao controle das incertezas com as quais se depara. Vencidas as barreiras conceituais, foi possível o desenvolvendo de métodos e ferramentas sobre probabilidade, amostragem e estatística, bem como sobre o comportamento humano, propiciando as condições necessárias ao melhor tratamento dos riscos.

Apesar desse instrumental, o processo de tomada de decisão em condições de incerteza e a previsão do futuro, ainda se mantêm como desafios, uma vez que os padrões estabelecidos pela natureza garantem o retorno dos eventos em apenas parte dos casos, em razão da interdependência entre os eventos e da interferência humana; da não disponibilidade de informações em qualidade e em quantidade adequadas à previsão sobre a ocorrência e o impacto dos eventos e do comportamento assimétrico do Homem frente à incerteza. A complexidade, e a grande variabilidade, tanto em frequência quanto em amplitude, das condições ambientais das organizações, ampliam ainda mais as dimensões deste desafio, exigindo a disponibilidade de sistemas integrados de gestão, capazes de analisar adequadamente as demandas do ambiente interno e externo e atender as necessidades das diversas partes interessadas.

Modernamente, risco é conceituado como a probabilidade da ocorrência de um evento, condição ou circunstância, com potencial para provocar desvios, positivos ou negativos, nos resultados planejados ou esperados, sendo quantificado em função da combinação da probabilidade de ocorrência e da magnitude ou impacto

de suas conseqüências.<sup>1</sup> A gestão de riscos é o processo sistemático, de identificação, análise, implementação de respostas e monitoramento de um amplo espectro de variáveis, necessário ao controle de ameaças e de oportunidades, objetivando o alcance de vantagem competitiva sustentável, por meio da maximização das áreas nas quais se dispõe de algum controle sobre os resultados, e minimização daquelas nas quais este controle não é possível ou nas quais não se dispõe de informações para o estabelecimento da relação de causa e efeito.<sup>2</sup> Além de sistemático o processo de gestão de riscos deve estar integrado à estrutura, à cultura e às práticas organizacionais, desenvolvendo-se em todos os níveis, processos e atividades da organização.

As organizações, como sistemas abertos, interagem com o ambiente específico de cada organização, caracterizado pelo mercado específico, fornecedores, concorrentes, e com o ambiente geral comum a todas as organizações. O processo de gestão de riscos deve contemplar as demandas e impactos relacionados com esse contexto externo, assim como com contexto interno da organização, e estabelecer mecanismos eficazes de comunicação com as diversas partes interessadas.<sup>3</sup>

Além da análise e definição dos contextos a ser considerados e o estabelecimento de mecanismos de comunicação com as partes interessadas, o processo de gestão contempla as atividades de estudo dos riscos, por meio da identificação, análise e avaliação; tratamento dos riscos; verificação ou monitoramento dos resultados e avaliação crítica e adequação.<sup>3</sup> Com deve ser sistemático e contínuo, o processo de gestão de riscos enquadra-se no modelo de controle de processos, denominado Ciclo PDCA, proposto por William Edwards Deming,<sup>4</sup> conforme esquematizado na Figura 1.

A indústria farmacêutica é um setor complexo de grande importância econômica, com uma base científica e tecnológica relevante, que vem sofrendo rápidas e significativas mudanças estruturais, especialmente na busca de ganho de escala em produção e em pesquisa e desenvolvimento, cuja competitividade é fortemente influenciada pela capacidade de inovação tecnológica contínua.<sup>5</sup> O processo de produção do setor é multidisciplinar, envolvendo em sua cadeia produtiva uma variada e extensa gama de fornecedores, prestadores de serviços e profissionais de diversas

áreas de conhecimento,<sup>6</sup> comportando quatro estágios de desenvolvimento tecnológico: pesquisa e desenvolvimento; produção de farmoquímicos; produção de especialidades farmacêuticas; marketing e comercialização de especialidades farmacêuticas.<sup>6</sup>



**Figura 1:** Processo de gestão de riscos modelado de acordo com o Ciclo PDCA

Pesquisas realizadas nos Estados Unidos da América<sup>7</sup> demonstram que o setor produtivo farmacêutico apresenta riscos significativos com relação a outros segmentos econômicos e que é altamente sensível aos impactos de eventos positivos ou negativos. Apesar da predominância de cultura de controles, o setor pode não alcançou o nível de excelência praticado por outros segmentos, como o financeiro e de seguro, apresentando o seguinte panorama:

- i. Predominam o processo subjetivo e a postura reativa na abordagem dos riscos;
- ii. Não há padronização do processo de gestão de riscos;
- iii. Está ocorrendo conscientização quanto à necessidade de adequação organizacional para a gestão de riscos, evidenciada pelo aumento da frequência de referências aos riscos nos relatórios das empresas;
- iv. Os riscos mais frequentemente relatados estão relacionados com as mudanças no ambiente competitivo, retenção de talentos, produtos em desenvolvimento, atraso no

lançamento de produtos e suprimento de insumos;

- v. As empresas com pior desempenho na gestão de riscos são as dotadas de estruturas organizacionais estanques e as de melhor desempenho são que adotam a estrutura matricial para a gestão de riscos.

## Aplicação do processo de gestão de riscos

Em função do porte, complexidade e características da organização, o processo de gestão demanda a aglutinação dos riscos em dimensões específicas, de forma a proporcionar uma visão estratégica consolidada,<sup>8</sup> sugerindo-se para o setor farmacêutico as seguintes dimensões de risco: mercado, produto, operacional e legal. As mudanças no ambiente competitivo, evidenciado como o principal risco,<sup>7</sup> a capacidade de inovação e a capacidade de introdução contínua de novos medicamentos no mercado, apontados como diferencial competitivo e principal fator de sucesso,<sup>9,10</sup> estão inseridas nas quatro dimensões de riscos sugeridas.<sup>6</sup>

O setor farmacêutico vem sofrendo pressões no sentido da melhoria da qualidade científica das decisões sobre a relação entre os benefícios e os riscos de seus produtos,<sup>11</sup> contemplando a gestão de riscos durante todo o ciclo de vida do produto, desde os testes pré-clínicos e clínicos até a fase de pós-comercialização, característica das atividades de farmacovigilância.<sup>12</sup> Em razão dessas pressões; da notoriedade que proporciona; por envolver as quatro dimensões de riscos sugeridas; da velocidade de produção de novas tecnologias, excipientes, formulações e indicações; dos impactos financeiros e sobre a imagem das empresas e de seus dirigentes; do aumento do número de consumidores e a possibilidade de impactos individuais e à saúde pública, o risco de reações adversas a medicamentos (RAM) foi selecionada para a contextualização do processo de gestão de riscos na indústria farmacêutica.

### DEFINIÇÃO DO CONTEXTO EXTERNO

O ambiente externo é composto por consumidores; profissionais e empresas da área de saúde; distribuidores e revendedores; órgãos nacionais e internacionais de monitoramento de problemas relacionados ao uso de medicamentos; organizações de defesa do

consumidor; órgãos de regulação, controle e fiscalização; controladores, acionistas e financiadores. O ambiente externo tem como principal característica a pressão social e regulamentar no sentido de que as empresas assumam a responsabilidade sobre os efeitos de seus medicamentos durante todo o ciclo de vida dos produtos, monitorando, tratando e informando as autoridades e consumidores sobre os eventuais problemas relacionados ao uso de medicamentos.

Em decorrência da gradual conscientização quanto aos direitos do consumidor e do estabelecimento de dispositivos legais de proteção, os problemas relacionados ao uso de medicamentos representam ameaças significativas à imagem, aos resultados e à própria sobrevivência das empresas, em decorrência, em especial, dos impactos financeiros e à imagem. A atitude pró-ativa com relação ao risco pode, por outro lado, se caracterizar em oportunidades para melhoria da imagem junto à sociedade, consumidores e órgãos de regulação e controle e pela possibilidade de identificação de novas indicações para o produto.

### **DEFINIÇÃO DO CONTEXTO INTERNO**

Internamente, a alta direção e os componentes de gestão de riscos organizacionais, de pesquisa e desenvolvimento, de produção e de qualidade estão envolvidos na gestão do risco relacionado ao uso de medicamento. É interessante a constituição de comitê específico para a gestão desse risco, constituído por representantes das principais áreas envolvidas.

### **DEFINIÇÃO DO CONTEXTO INTERNO DA GESTÃO DO RISCO**

A gestão de riscos associados ao uso de medicamentos está inserida do contexto da farmacovigilância, caracterizada pelo conjunto de atividades de identificação precoce, avaliação, compreensão e prevenção de efeitos adversos ou relacionados ao uso, após a introdução do medicamento no mercado, objetivando a promoção do uso seguro de medicamentos pela população.<sup>13</sup>

Em razão de sua importância estratégica, a gestão desse risco será contemplada na política geral da organização, garantindo-se os recursos necessários à sua consecução e definindo-se as atribuições e responsabilidades das partes envolvidas. Os

objetivos da gestão do risco são a identificação de falhas nos processos de pesquisa e desenvolvimento, comercialização e marketing; a redução das taxas de morbidade e de mortalidade; redução do impacto financeiro e sobre a imagem da empresa; comunicação aos órgãos de regulação, fiscalização e controle, profissionais da área de saúde e consumidores em geral e a identificação de eventuais oportunidades de melhoria do posicionamento competitivo.

### **DEFINIÇÃO DOS CRITÉRIOS DE RISCO**

O estudo e tratamento dos riscos relacionados ao uso de medicamentos têm como principal critério de abordagem o consumidor final, tanto individual como coletivamente, contemplando análises do ponto de vista de *marketing*, técnico, financeiro, legal, humanitário, social. No âmbito deste artigo, serão considerados apenas os critérios quanto ao consumidor como paciente.

### **COMUNICAÇÃO COM AS PARTES INTERESSADAS**

O ciclo de comunicação e consulta com relação aos riscos associados ao uso de medicamentos é constituído por pacientes; profissionais e organizações da área de saúde; pesquisadores da academia e do setor produtivo; indústria farmacêutica; revendedores de medicamentos; órgãos de regulação, fiscalização e controle e organizações e sistemas de farmacovigilância. Os instrumentos de comunicação são as notificações de Reações Adversas de Medicamento (RAM), alertas e informes das organizações de farmacovigilância, bulas, prospectos, notas, artigos técnicos e científicos, informativos e matérias na imprensa comum ou especializada, difundidos em meio eletrônico ou impresso, ou em congressos, seminários, palestras e cursos específicos.<sup>14</sup>

### **IDENTIFICAÇÃO DOS RISCOS**

Consiste na identificação de problemas de segurança não identificados antes da comercialização do medicamento, por meio da identificação de casos clínicos individuais ou de séries históricas.<sup>13</sup> O principal risco relacionado ao uso de medicamentos é caracterizado pela Reação Adversa ao Medicamento (RAM),<sup>15</sup> definida como “reação nociva e involuntária, que ocorre em doses geralmente utilizadas no homem para

profilaxia, diagnóstico, ou tratamento de doença ou para a modificação de funções fisiológicas”.<sup>16</sup> Atualmente, além da RAM, foram agregados ao contexto da gestão do risco:<sup>13, 15, 16</sup>

- i. Perda de eficácia;
- ii. Desvios de qualidade;
- iii. Uso indevido acidental ou deliberado;
- iv. Abuso;
- v. Intoxicação;
- vi. Falha terapêutica;

- vii. Erros de medicação;
- viii. Evento adverso;
- ix. Interações medicamentosas;
- x. Efeitos colaterais positivos ou negativos.

As reações adversas a medicamentos (RAM) podem ser classificadas conforme indicado na Figura 2, evidenciando que as RAM do tipo “B”, não relacionadas à dose, são mais difíceis de prever e de identificar.

Tipo de reação	Mnemônico	Características	Exemplos
A Relacionada à dose	Aumento	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comum</li> <li>• Relacionada a um efeito farmacológico da droga</li> <li>• Esperada</li> <li>• Baixa mortalidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efeitos tóxicos: Intoxicação; síndrome serotoninérgica com ISRSs</li> <li>• Efeitos colaterais: efeitos anticolinérgicos de antidepressivos tricíclicos</li> </ul>
B Não relacionada à dose	Bizarro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incomum</li> <li>• Não relacionada a um efeito farmacológico da droga</li> <li>• Inesperada</li> <li>• Alta mortalidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reações imunológicas: hipersensibilidade à penicilina</li> <li>• Reações idiossincráticas: porfiria aguda, hipertermia maligna, pseudoalergia (ex: rash em uso de ampicilina)</li> </ul>
C Relacionada à dose e ao tempo de uso	Crônico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incomum</li> <li>• Relacionado ao efeito cumulativo do fármaco</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Supressão do eixo hipotalâmico – hipofisário – adrenal por corticosteróides</li> </ul>
D Relacionada ao tempo de uso	Atraso	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incomum</li> <li>• Normalmente relacionado à dose</li> <li>• Ocorre ou aparece algum tempo após o uso do medicamento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teratogênese (ex.: adenocarcinoma associado ao dietilestilbestrol)</li> <li>• Carciongênese</li> <li>• Discinesia tardia</li> </ul>
E Abstinência	Fim do uso	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incomum</li> <li>• Ocorre logo após a suspensão do medicamento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome da abstinência a opiáceos</li> <li>• Isquemia miocárdica (supressão de â-bloqueador)</li> </ul>
F Falha esperada na terapia	Falha	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comum</li> <li>• Relacionada à dose</li> <li>• Frequentemente causado por interação de medicamentos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dosagem inadequada de anticoncepcional oral, particularmente quando utilizados indutores enzimáticos</li> </ul>

Figura 2: Classificação de reações adversas a medicamentos – continuação.<sup>15</sup>

## ANÁLISE DOS RISCOS

A análise dos riscos consiste na caracterização do nível de risco (NR) de cada evento, constituído pela combinação da probabilidade de ocorrência e da extensão de seu impacto. No caso das RAM's, devem ser avaliadas a força da relação de causalidade e a frequência dos eventos clínicos identificados. Para a análise dos riscos, o UPPSALA MONITORING CENTRE (UMC) prevê os seguintes protocolos para análise de riscos de RAM:<sup>16</sup>

### i. Avaliação da causalidade de eventos com RAM

- **Certo:** um evento clínico que ocorre em um prazo plausível após a administração do medicamento e que não pode ser explicado por doença concomitante ou outros medicamentos. A reação à retirada do medicamento deve ser clinicamente plausível. O evento deve ser farmacologicamente definitivo, executando-se, se necessário, procedimento de re-exposição;
  - **Provável:** um evento clínico que ocorre em um prazo razoável após administração do medicamento, com baixa possibilidade de ser atribuído a doença concomitante ou a outro medicamento ou substâncias químicas e que oferece uma resposta clínica razoável à retirada do medicamento. Não é requerida a re-exposição;
  - **Possível:** um evento clínico que ocorre em um prazo razoável após administração do medicamento, mas que pode ser explicado por doença concomitante ou outros medicamentos ou substâncias químicas. Não se requer informação sobre o efeito da retirada da droga;
  - **Improvável:** um evento clínico no qual o tempo decorrido entre a administração do medicamento e os efeitos investigados não indica uma relação de causalidade e em que outras drogas, produtos químicos ou doença subjacente fornecem explicações plausíveis;
  - **Condicional:** mm evento clínico que requer dados adicionais ou análise mais detalhada dos dados disponíveis;
  - **Não classificável:** um evento clínico que não pode ser avaliado, em decorrência da insuficiência ou inconsistência das informações disponíveis.
- ii. Para a probabilidade a UMC recomenda a adoção do critério esquematizado na Figura 3, que representa a frequência de casos na população estudada;
- iii. Quanto ao impacto ou conseqüência a UMC estabelece os seguintes critérios para as reações adversas que devem ser

consideradas como “graves”:<sup>16</sup>

- resultar em incapacidade significativa ou persistente;
- requerer hospitalização ou o dilatação do tempo de hospitalização do paciente;
- oferecer risco à vida do paciente;
- resultar em morte.

iv. São também consideradas como reações graves a malformação congênita e os efeitos clinicamente significantes;<sup>14, 15</sup>

vi. As reações não enquadradas nas condições acima relatadas são consideradas “não graves”.<sup>15</sup>

Classificação	Frequência	
	ocorrência/população	%
Muito comum	> 1/10	> 10
Comum (frequente)	> 1/100 e < 1/10	> 1 e < 10
Incomum (infrequente)	> 1/1.000 e < 1/100	> 0,1 e < 1
Rara	> 1/10.000 e < 1/1.000	> 0,01 e < 0,1
Muito rara	> 1/10.000	> 0,01

**Figura 3:** Classificação das reações adversas a medicamento quanto à frequência. <sup>16</sup>

## AVALIAÇÃO DOS RISCOS

O nível de risco obtido da composição entre a relação de causalidade, a frequência e a gravidade das conseqüências dos eventos observados será o parâmetro utilizado para a categorização e avaliação dos riscos, tendo como principal objetivo a revisão periódica da relação entre os benefícios e os riscos oferecidos pelo medicamento sob análise.<sup>13, 14</sup> A relação benefícios/riscos deve ser avaliada em variados aspectos de uma perspectiva dos interesses da empresa, tais como financeiro, de imagem, legal, cultural, de mercado, operacional. A análise da relação benefícios/riscos também deve ser realizada de uma perspectiva social e econômica e da aceitabilidade social.<sup>13, 15</sup>

## TRATAMENTO DOS RISCOS

A partir das avaliações da relação benefícios/riscos são selecionadas as diversas opções de tratamento, objetivando a redução da frequência e da gravidade das RAM's com impactos negativos e a exploração

das eventuais oportunidades daquelas com resultados positivos. A natureza, extensão e profundidade das medidas de tratamento dos riscos podem variar em uma larga faixa de opções, em função das características da organização, do mercado, da sociedade e de cada risco em particular, podendo ser apontadas as seguintes alternativas genéricas, relativas à natureza do medicamento e das condições de uso:<sup>13, 14, 15</sup>

- i. Comunicação dos riscos aos órgãos públicos de regulação e fiscalização e organizações especializadas em monitoramento de RAM's;
- ii. Investigação das estratégias, procedimentos e recomendações quanto ao uso adequado e quanto à prevenção de RAM's;
- iii. comunicação dos riscos e recomendações aos profissionais de saúde e pacientes;
- iv. Alteração de textos de bulas, prospectos e informativos distribuídos aos usuários e profissionais da área de saúde;
- v. Qualificação de médicos e outros profissionais da área de saúde;
- vi. Adequação dos procedimentos de monitoramento da qualidade de insumos, produtos, instalações e utilidades;
- vii. Aperfeiçoamento dos procedimentos de desenvolvimento de medicamentos;
- viii. Adequação do produto;
- ix. Lançamento de novos produtos;
- x. Retirada do produto do mercado.

### MONITORAMENTO E ANÁLISE CRÍTICA

A natureza, frequência e gravidade das RAM's devem ser monitoradas e analisadas de forma permanente, para avaliação da efetividade, eficiência e eficácia dos tratamentos aplicados ao risco, bem como para identificação de eventuais mudanças nas condições que possam afetar aqueles fatores, os custos dos tratamentos e os resultados esperados. Eventuais adequações que se mostrarem necessárias devem ser planejadas e implantadas, repetindo-se o ciclo tantas vezes quantas se fizerem necessárias.

## Conclusões

Em decorrência do ambiente competitivo e turbulento e de novas demandas sociais, econômicas e legais, além

do cumprimento da missão e do alcance de metas específicas, as organizações têm sido cada vez mais exigidas no sentido de demonstrar a disponibilidade de sistemas estruturados de gestão de riscos. No caso da indústria farmacêutica, a implementação de processos sistemáticos de gestão de riscos é ainda mais premente, em razão de sua alta sensibilidade, do impacto decorrente da emergência de novas tecnologias e do processo de reestruturação do setor.

### REFERÊNCIAS

1. FERMA – Federation of European Risk Management Associations. Estándares de Gerencia de Riesgos. Bruxelas, **2003**. Disponível em <[http://www.theirm.org/publications/documents/rm\\_standard\\_spanish\\_15\\_11\\_04.pdf](http://www.theirm.org/publications/documents/rm_standard_spanish_15_11_04.pdf)> Acessado em 14/03/2008
2. Bernstein, Peter I. *Desafio aos Deuses: A Fascinante História do Risco*. Tradução de Ivo Korylowski 18. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, **1997**.
3. Comitê OB – 007 de Gestão de Riscos, Standards Austrália e Standard New Zealand. *Gestão de Riscos – A Norma AS/NZS 4360:2004*. Risk Tecnologia Editora. São Paulo, **2004**.
4. Falconi, Vicente Campos. *Qualidade Total: Padronização de empresas*. Belo Horizonte: Fundação Cristiano Otoni, **1992**.
5. Andricopulo, Adriano D.; Garrat, Richard D.; OLIVA, Glaucius. *Revista Estudos*. Goiânia, v.32, n. 11, nov. **2005**.
6. Vieira, Vera M. da Motta, Ohayon, Pierre. *Inovação em Fármacos e medicamentos: Estado-da-arte o Brasil e políticas de P&D*. **2006**. Disponível em <<http://www.pucmg.br>>. Acessado em 16/05/2008.
7. KPMG. *Pharmaceutical companies need to improve their risk management framework*: KPMG. Continuity Central, **2005**. Disponível em <<http://www.continuitycentral.com>>. Acessado em 20/05/2008.

8. Duarte Júnior, Antonio Marcos; Pinheiro, Fernando Antonio Perrone; JORDÃO, Manoel Rodrigues; BASTOS, Norton Torres. Gerenciamento de riscos corporativos: Classificação, definições e exemplos. UNIBANCO Global Risk Management, São Paulo, **2000**.
9. Alvarez, Vitor M. Pelaez. G.D. Searle: Os limites de crescimento de uma empresa Farmacêutica. **1998**. Textos para Discussão. Disponível em: <<http://www.economia.ufpr.br/publica/textos/1998/txt0298%20Victor%20limite%20cresc.doc>> Acessado em 12/05/2008
10. Hermel, Philippe, Bertoli, Annie. *The TQM Magazine*, v. 13, n. 3, **2001**.
11. Edward, Brian. *Drug Safety* **2004**, 27(08):609-617.
12. Tsintis, Panos; La Mache, Edith. *Drug Safety* **2004**, 27(8):509-517.
13. Dias, Murilo Freitas; Souza, Nair R.; Bittencourt, Milena O.; Nogueira, Márcia S. *Fármacos & Medicamentos*, São Paulo, **2005**, v.34, n. VI.
14. Dias, Murilo Freitas. *Fármacos & Medicamentos*, São Paulo, **2004**, v. 31, n. V.
15. Figueiredo, Patrícia Mandali de; Costa, Alessandra A.; Santa Cruz, Fernanda do C.; Melo, José R. R.; Nogueira, Márcia S.; Góes, Tâmara P. A. *Fármacos & Medicamentos*, São Paulo, **2005**, v. 34, n. VI.
16. UMC, The Uppsala Monitoring Centre. Practical Pharmacovigilance. Disponível em <<http://www.who-umc.org>> Acessado em 03/06/2008.

---

## Wolney Cardoso da Silva\*<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Analista Técnico do Banco Central do Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, Anápolis, Brasil

E-mail: wolney.cardosodasilva@gmail.com.br

# Inovação Tecnológica Industrial



Pela observação do cenário industrial mundial se percebe que divergência entre taxas de crescimento entre nações é diretamente relacionada à disposição do seu parque industrial para a prática da competição tecnológica. Tanto no enfoque geopolítico, quanto no produtivo, países ou indústrias que se mantêm na liderança se caracterizam pelo processo de desenvolvimento tecnológico. Esse processo é o fruto do estreito relacionamento entre a pesquisa e o empreendedorismo, e em sintonia com a governança pública, em sua função de indutora.

Do relacionamento pesquisa-empendedorismo surgem as inovações tecnológicas industriais que criam valor aos processos produtivos, mas geram incerteza contínua na proporção deste mesmo relacionamento. Conseqüentemente, tensão é gerada na cadeia de valor com tal força que promove o realinhamento de estratégias de negócio e de perfil do profissional na indústria. Essa tensão é, então, direcionadora para a formatação e gestão dos negócios que buscam ambos a sobrevivência e a competitividade pela reformulação da visão e da estratégia da organização.

Adotar nova visão e estratégias implica em modificar “zonas de conforto” da cultura da organização industrial demandando recursos e tempo consideráveis. Este processo organizacional é caracterizado pelo esforço no alinhamento dos ativos hodiernos da tecnologia, do conhecimento e da informação, orientados à competitividade. São necessários reformulação de processos e produtos e o acultramento das pessoas, pois inovação permanente, diferenciação de produtos e aprendizagem são fundamentos da competitividade. Nesse cenário, as indústrias líderes entendem a complexidade

*Adotar nova visão e estratégias implica em modificar “zonas de conforto” da cultura da organização industrial demandando recursos e tempo consideráveis.*

do processo da competitividade, a qual permeia o estudo, a formulação e a melhoria contínua das técnicas de gerenciais e de produção, necessariamente precedidos da agregação de capital intelectual à organização.

Forte oponente à competitividade proporcionada pela inovação tecnológica industrial são a incapacidade promovida por certa cultura organizacional em aceitar ativamente os resultados científicos como oportunidades de negócio. A indústria é vulnerável quando sua base tecnológica da indústria é composta tão simplesmente por técnicas tradicionais e pela dependência da absorção de tecnologia importada. Objetiva-se, então, tanto o fortalecimento da pesquisa como a principal atividade geradora de conhecimento, quanto o resultado tecnológico dessas pesquisas sendo incorporadas no processo produtivo.

Recorrendo à história do desenvolvimento tecnológico industrial se verifica uma sucessão hegemônica de centros empreendedores do conhecimento, como: Inglaterra, Alemanha e Estados Unidos. O fundamento

para a densa geração e utilização do conhecimento se associa às condições favoráveis à prática da pesquisa pragmática e orientada ao progresso da tecnologia e, conseqüentemente, ao desenvolvimento econômico. Foca-se em mover-se a fronteira do conhecimento para áreas de futuro econômico (e social) promissor, como nanotecnologia, biotecnologia e os novos materiais. Neste diapasão, estudiosos e historiadores denominam esta como uma economia do conhecimento, em que inovação e qualificação são fatores críticos do sucesso.

Para o setor industrial são paradoxais as políticas de desenvolvimento que assumem o modelo da cadeia linear da inovação tecnológica, o qual propõe que a tecnologia é resultado natural da pesquisa científica massificada, não a pesquisa induzida aos propósitos da competitividade. Já um modelo liberal e pragmático propõe um conceito de inovação, enquanto produto tecnológico na forma de recurso para a competitividade, diretamente relacionado ao empreendedorismo, e enfoca a pesquisa como processo de desenvolvimento da tecnociência.

A busca pela sobrevivência e pelo crescimento industrial em médio e longo prazo desafia as indústrias a se aproximarem das áreas dinâmicas do conhecimento, apesar do difícil exercício da mudança da cultura organizacional e visão. A dinâmica da inovação e da difusão de tecnologias determina comportamentos empresariais diferenciados que demandam capacidades para gestão da pesquisa e do desenvolvimento tecnológico, seja na própria indústria, seja pela parceria assumida ou induzida, pela governança pública, com centros geradores de conhecimento. Assim, constitui elemento fundamental para a sustentabilidade industrial a articulação entre produção de conhecimento, e, especificamente, em seu *locus* privilegiado – a universidade. Redes que articulam pesquisadores de universidades e profissionais das indústrias aprofundam as relações entre o desenvolvimento pragmático da tecnociência e, conseqüentemente, da inovação.

A abordagem do respeitado estudioso Henry Etzkowitz identifica o modelo da Hélice Tríplice a qual situa a dinâmica da inovação pertencente ao campo das relações entre universidade, indústria e governo (as três hélices). Consideram-se as influências de cada hélice sobre as demais e seu efeito recursivo. O modelo discute

a gestão da propriedade intelectual, a comercialização da tecnologia, a titularidade de patentes acontecendo em parceria com as universidades, especialmente, por meio de empresas de base tecnológica. Essas empresas são criadas, em parceria com as indústrias, mas no seio das universidades, muitas vezes resultantes de processos de incubação, outras vezes de processos naturais de empreendedorismo. Objetiva-se dar foco pragmático à pesquisa e seu produto, preservando seu core business da indústria e desonerando da necessidade de mudança de cultura na implantação de centro próprio de desenvolvimento, mas assegurando sua parte nos produtos de tecnociência gerados.

Da parte do poder público se toma o *Bay Dole Act* o qual regula e viabiliza a comercialização de tecnologias desenvolvidas com recursos públicos em universidades norte-americanas. Da mesma forma, no Brasil, tem-se a Lei da Inovação federal, a qual regula e oportuniza a colaboração e parceria entre as universidades com o setor industrial. Diversos estados aprovaram e outros trabalham em leis de inovação estaduais.

O modelo da Hélice Tríplice não é proposta, mas identificação. Identifica a organização, as práticas e os atores que levam o processo de inovação industrial mais próximo do sucesso e, conseqüentemente, à sobrevivência empresarial e ao crescimento industrial. Portanto, sugere-se aqui sua busca por meio de programas de pesquisa cooperativa (redes de pesquisa) envolvendo: (i) o setor do conhecimento tipicamente, mas não exclusivamente, acadêmico, como fonte de capital intelectual; (ii) o setor produtivo, em especial o industrial, como direcionador de necessidades e oportunidades por meio da contratação de parcerias; e (iii) a governança pública, como indutora da organização do sistema de pesquisa tecnocientífica.

---

## Leonardo Guerra de Rezende Guedes

Presidente da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).



# Planejamento de Novos Fármacos: Inovação e Integração

A indústria farmacêutica está constantemente voltada às inovações científicas e tecnológicas. O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, que engloba várias etapas desde a pesquisa básica até o lançamento do novo medicamento no mercado farmacêutico, passando ainda pelas triagens clínicas, caracteriza-se pelos elevados níveis de investimentos em pesquisa e desenvolvimento (P&D).

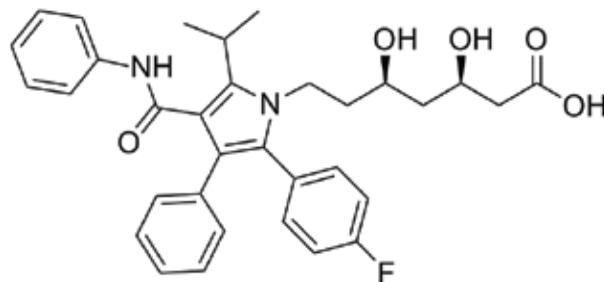
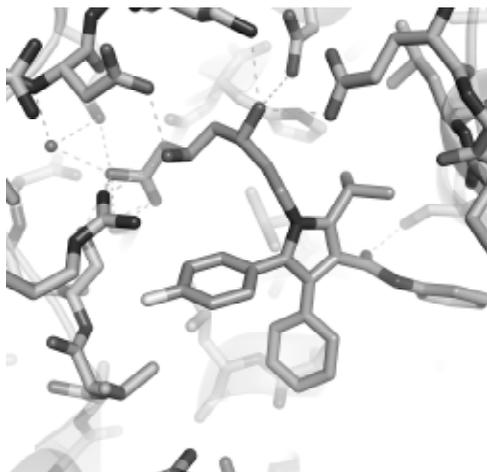
A clínica médica foi beneficiada nas últimas décadas por diversas inovações terapêuticas fantásticas, resultado do processo bem-sucedido de P&D de fármacos realizado pela indústria farmacêutica. A notável evolução da Química Medicinal moderna tem contribuído de forma significativa na descoberta de uma variedade de novas entidades químicas (NCEs, do inglês, *New Chemical Entities*) com inúmeras propriedades farmacológicas.

A descoberta de fármacos de enorme sucesso, que fazem parte da categoria dos *blockbusters*, termo do inglês usado para designar os medicamentos com vendas anuais superiores a US\$ 1 bilhão, é o alicerce do desenvolvimento da indústria mundial. Como exemplo, pode ser citado o fármaco com ação hipolipemiante Lípitor® (atorvastatina), da companhia farmacêutica americana Pfizer (Figura 1). Este medicamento exerce a sua ação terapêutica através da inibição reversível da enzima humana 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), controlando assim a conversão de HMG-CoA em mevalonato, uma etapa limitante na regulação da biossíntese do colesterol.

A inovação e a integração são componentes fundamentais para o crescimento e desenvolvimento da área de P&D de fármacos.

*A inovação e a integração são componentes fundamentais para o crescimento e desenvolvimento da área de P&D de fármacos.*

O Lípitor, fármaco sintético da classe das estatinas, foi introduzido na clínica médica em 1997 e logo se tornou líder de mercado. O medicamento pioneiro desta classe, um composto de origem natural denominado Mevacor® (lovastatina), foi introduzido no mercado em 1987 pela empresa farmacêutica Merck. Pertencem ainda a classe das estatinas, os medicamentos Zocor® (sinvastatina, da Merck), Crestor® (rosuvastatina, da AstraZeneca) e Lescol® (fluvastatina, da Novartis), todos com efeito redutor de colesterol. O exemplo do Lípitor é importante para ilustrar a competitividade no setor farmacêutico e o papel da inovação na área de P&D de fármacos. Embora já existissem outros fármacos desta mesma categoria no mercado, que a época era amplamente dominado pelo Zocor, a inovação promovida pelos enormes benefícios terapêuticos do Lípitor, foi o elemento chave para uma mudança extraordinária no panorama farmacêutico. O Lípitor se transformou rapidamente no medicamento de maior sucesso de vendas de toda a história da indústria farmacêutica, sendo capaz, por exemplo, de gerar novas receitas da ordem de US\$ 12,68 bilhões, somente em 2007.



**Figura 1:** Interação intermolecular fármaco-receptor (à direita) e estrutura química (à esquerda) do Lípitor.

Os ensinamentos no caso do Lípitor, que se estendem a diversos outros exemplos clássicos, são muito claros, é preciso inovar para crescer, e para crescer é preciso desafiar, principalmente na área de P&D de novos fármacos. Prova inequívoca disso se verifica no fato de que nenhum outro tipo de indústria no mundo investe tanto em tecnologia e inovação, como a indústria farmacêutica. A Pfizer, que é a maior companhia farmacêutica de P&D de fármacos do mundo, em números atuais, alcançou US\$ 48,4 bilhões em vendas em 2007. Para atingir suas metas de crescimento e desenvolvimento, a Pfizer investiu neste mesmo ano um total de US\$ 8,1 bilhões em P&D, aproximadamente 17% de seu faturamento bruto. Este é certamente um exemplo de gestão moderna marcada por investimentos arrojados capazes de garantir um presente de sucesso e um futuro bastante promissor no mercado mundial.

O processo de P&D na indústria farmacêutica está ligado a um elemento de vital importância: a inovação. O grande desafio de nosso país é ganhar novas fronteiras e modernizar o modelo atual de mercado, para que possamos alcançar um segundo elemento fundamental: a integração. Em todos os setores produtivos, as expectativas sobre inovação e integração devem ser administradas apropriadamente para que as melhores decisões possam ser tomadas, tornando esta tarefa menos árdua e levando a resultados mais profícuos. A dependência tecnológica nacional tornou-se quase que total em áreas estratégicas, como a saúde humana, a agropecuária e o meio ambiente,

que afetam milhões de indivíduos em diversas regiões geográficas importantes. As empresas nacionais, em razão da carência de capital de risco e pessoal qualificado, não têm investido em P&D de fármacos, salvo algumas exceções muito recentes. Por outro lado, as multinacionais instaladas no país não se dedicam a P&D, reservando estas atividades exclusivamente para suas matrizes nos países desenvolvidos. Outros aspectos históricos que contribuíram para este panorama foram a ausência de uma lei definida de patentes e a falta de uma política industrial clara de incentivo a estas atividades.

Em tempos modernos e olhando para o futuro, o Brasil não pode mais continuar produzindo com tecnologia importada, sem cultura de investimento de risco e sem uma agenda efetiva de aplicação em inovação. O panorama farmacêutico tem se alterado nos últimos anos a partir da decisão do Governo Federal de incluir os fármacos como uma das quatro áreas estratégicas e prioritárias para o país, com reflexos concretos na criação de novas políticas de investimentos para este setor, incentivando o seu crescimento e desenvolvimento. A Lei de Inovação (Lei no 10.973 de 2 de dezembro de 2004), aprovada pelo Congresso Nacional, estabelece os incentivos à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo, gerando um ambiente favorável para o eficiente intercâmbio entre universidade e empresa, com a conseqüente transferência de tecnologias para o setor produtivo.

Os Governos Estaduais, através de suas FAPs

(Fundações de Amparo à Pesquisa) e uma articulação eficaz junto às grandes lideranças acadêmicas e empresariais, devem estar atentos a responsabilidade que lhes cabem e assumir seu papel na criação de programas de incentivo à pesquisa e a inovação na área de medicamentos. Graças aos significativos investimentos realizados pelos órgãos de fomento do país na formação de recursos humanos, temos hoje competências estabelecidas em todas as áreas fundamentais do conhecimento, com contribuições científicas importantes e reconhecidas internacionalmente. Falta-nos, no entanto, uma maior massa crítica e, especialmente, mais foco tecnológico.

A realidade atual da indústria farmacêutica brasileira é ainda de pouca tradição em P&D de novos produtos proprietários, particularmente na área de novos medicamentos. Estabelece-se, assim, um novo paradigma sob o qual se planeja desenvolver e consolidar o setor farmacêutico no país: a tríade Empresa – Universidade – Governo. Pretende-se, desta forma, reunir as competências em inovação das universidades e dos institutos de pesquisa; a experiência, o conhecimento do mercado brasileiro, a infra-estrutura e a competência em gestão das principais indústrias farmacêuticas nacionais; e o apoio fundamental do governo com linhas de financiamento adequadas para projetos competitivos e inovadores direcionados ao setor mediante uma política clara de incentivos diretos aos investimentos em P&D de fármacos.

O papel da universidade, da indústria e do governo é fundamental no estabelecimento de uma cultura de

investimentos voltado à transferência de novas tecnologias com foco em inovação. Um caminho promissor no Estado de Goiás pode ser marcado pela integração do rico pólo farmacêutico de Anápolis, com o mestrado Profissional em Tecnologia Farmacêutica (CAPES/MEC) organizado na tríade Universidade Católica de Goiás (UCG) – Universidade Estadual de Goiás (UEG) – Centro Universitário de Anápolis (UniEVANGÉLICA). O estabelecimento de parcerias com o setor produtivo, com o governo e com outras instituições de ensino e pesquisa, será um diferencial importante para o desenvolvimento farmacêutico da região. A parceria estabelecida entre o mestrado Profissional em Tecnologia Farmacêutica e a Universidade de São Paulo, através do projeto governamental PROCAD/CAPES, é um exemplo que merece destaque por seu caráter pioneiro na conquista de novas fronteiras na área de P&D de fármacos.

O futuro do setor farmacêutico nacional passa essencialmente por gestões modernas com investimentos arrojados em novas competências e tecnologias, visando o estabelecimento eficaz do binômio inovação e integração.

---

## Adriano D. Andricopulo

Diretor da Divisão de Química Medicinal da Sociedade Brasileira de Química, coordenador do Laboratório de Química Medicinal e Computacional do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural da FAPESP e membro afiliado da Academia Brasileira de Ciências.



# Instruções para envio de artigos para a Revista Processos Químicos

## Prezado(a) autor(a),

Para que seu artigo possa entrar em nosso processo de avaliação para possível publicação na Revista Processos Químicos, o mesmo deverá satisfazer as seguintes condições:

- ▶ Utilizar somente o editor Microsoft Word, numerando todas as páginas;
- ▶ Conter no máximo 40 laudas, incluindo Figuras, Tabelas, Esquemas etc;
- ▶ Conter Resumo e *Abstract*, ambos com até 100 palavras;
- ▶ Conter Palavras-chave e *Keywords*, ambos com até 3 palavras;
- ▶ Título com no máximo 20 palavras;
- ▶ Titulação do autor (créditos). Dados pessoais do autor: endereço, telefone, e-mail;
  
- ▶ As figuras, tabelas, esquemas etc devem ser colocadas após as referências e devidamente identificadas. Se escaneadas, devem ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão TIF ou JPEG. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) devem ser enviadas com extensão tif/jpg, para não termos problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: CDR, EPS ou CDX. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm) ou, excepcionalmente, de 2 colunas (17,5 cm).

► As figuras (gráficos, esquemas, etc.) deverão ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco).

► A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores (para a revista, a menor unidade é o departamento). Havendo autores com diferentes endereços estes deverão se seguir imediatamente ao nome de cada autor. Os autores devem ser agrupados por endereço. Indicar com asterisco(\*) o autor para correspondência, colocando seu e-mail no rodapé desta página (um só e-mail). A segunda página deverá conter o título, o resumo e o abstract do trabalho;

► As referências bibliográficas deverão ser numeradas e todas citadas no final do artigo. Será utilizada a abreviatura da revista como definida no *Chemical Abstracts Service Source Index* (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo. Exemplos de citações:

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.
2. Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708.
3. Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123;
4. Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.
5. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.
6. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

► Espaço duplo entre linhas;

► Fonte: *Times New Roman* 12;

► Enviar uma cópia do artigo, acompanhada de carta de encaminhamento à Editoria da Revista Processos Químicos, para o seguinte endereço eletrônico: [revistapq.senai@sistemafieg.org.br](mailto:revistapq.senai@sistemafieg.org.br);

# SENAI Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial

## SENAI

**Faculdade de Tecnologia Senai Ítalo Bologna**  
R. Armogaste J. Silveira, nº 612, Setor Centro-Oeste  
CEP 74560-020 - Goiânia-GO  
Fone: (62) 3226-4500 - Fax: (62) 3226-4504  
e-mail: fatecib.senai@sistemafieg.org.br

**Núcleo de Confeção de Trindade**  
Rua 7, esquina com Rua 8, Quadra 10, nº 939  
Setor Guarujá Parque  
CEP 75380-000 - Trindade-GO  
Fone: (62) 3505-1293

**Núcleo de Confeção de Jaraguá**  
Av. Cristóvão Colombo de Freitas, Quadra 4  
Lotes 1 e 2, Setor Aeroporto  
CEP 76330-000 - Jaraguá-GO  
Fone/Fax: (62) 3326-3737

**Faculdade de Tecnologia Senai Roberto Mange**  
Rua Engenheiro Roberto Mange, nº 239  
Bairro Jundiá - CEP 75113-630 - Anápolis-GO  
Fone: (62) 3902-6200 - Fax: (62) 3902-6226  
e-mail: fatecrm.senai@sistemafieg.org.br

**Núcleo de Educação Profissional Senai Luziânia**  
Rua Bahia, s/n, Parque Viegas - Luziânia-GO  
CEP 72800-000 - Fone: (61) 3622-1103

**Faculdade de Tecnologia Senai de Desenvolvimento Gerencial**  
Rua 227-A, nº 95, Setor Leste Universitário  
CEP 74610-060 - Goiânia-GO  
Fone: (62) 3269-1200 - Fax: (62) 3269-1233  
e-mail: fatesg.senai@sistemafieg.org.br

**Escola Senai Itumbiara**  
Rua Olívia Garcia Fagundes, nº 32  
Bairro Paranaíba - CEP 75503-970 - Itumbiara-GO  
Fone/Fax: (64) 3404-2002

**Escola Senai Vila Canaã e Unidades Móveis**  
Rua Prof. Lázaro Costa, nº 348, Vila Canaã  
CEP 74415-420 - Goiânia-GO  
Fone/Fax: (62) 3558-3344  
e-mail: canaa.senai@sistemafieg.org.br

**Escola Senai Catalão**  
Av. Dr. Lamartine P. Avelar, nº 1.400  
Setor Universitário - CEP 75704-020 - Catalão-GO  
Fone/Fax: (64) 3411-1065  
e-mail: catalao.senai@sistemafieg.org.br

## SESI SENAI

**Unidade Integrada Sesi Senai Rio Verde**  
Av. Guanabara, nº 217, Setor Pausanes  
CEP 75902-740 - Rio Verde-GO  
Fone/Fax: (64) 3602-2752 / (64) 3612-1110  
e-mail: senaifb@sistemafieg.org.br

**Unidade Integrada Sesi Senai Aparecida de Goiânia  
(Centro de Atividades Prof. Venerando de Freitas Borges)**  
Rua dos Pirineus, Quadra 1, Lote 1  
Residencial Village Garavelo  
CEP 74912-260 - Aparecida de Goiânia-GO  
Fone/Fax: (62) 3283-1300  
e-mail: aparecida.sesi@sistemafieg.org.br

**Unidade Integrada Sesi Senai Niquelândia**  
Av. Brasil, Quadras 26 e 27,  
Conjunto Habitacional Codemin, Jardim Atlântico, 1ª etapa  
CEP 76420-000 - Niquelândia-GO  
Fone/Fax: (62) 3354-1802 / (62) 3354-1750  
e-mail: misclay.senai@sistemafieg.org.br

**Núcleo Integrado Sesi Senai Barro Alto**  
Rua Américo Borges, Centro - CEP 76390-000  
Barro Alto-GO - Fone: (62) 3347-6150  
Fax: (62) 3354-1750

**Unidade Integrada Sesi Senai Sama**  
Mina Cana Brava, Caixa Postal 04 - Minaçu-GO  
CEP 76450-000 - Fone: (62) 3379-1039  
Fax: (62) 3379-7012  
e-mail: sama.senai@sistemafieg.org.br

# FAPEG

## Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás

### O que é?

A FAPEG é a fundação do Governo Estadual para o fomento ao desenvolvimento científico e tecnológico de Goiás. Seus recursos financeiros são assegurados pela Constituição do Estado.

### Missão

Fomentar a pesquisa e a difusão do conhecimento, financiar a formação científica e induzir a inovação tecnológica para o desenvolvimento do Estado de Goiás.

### Visão

Ser reconhecida como o principal agente indutor do desenvolvimento científico, tecnológico e de inovação no Estado de Goiás.

### Como atua

- Financia projetos de pesquisa científica e tecnológica;
- Financia a capacitação de recursos humanos para Pesquisa e Desenvolvimento, por meio de bolsas em diversos níveis de formação;
- Contribui para a consolidação de grupos de pesquisa científica e tecnológica;
- Promove integração entre o setor produtivo e setor do conhecimento;
- Apóia a realização e organiza eventos de caráter científico e tecnológico;
- Divulga os resultados das pesquisas.

<http://www.fapeg.go.gov.br>  
(62) 3201-8081



**GOVERNO DO  
ESTADO DE GOIÁS**

Desenvolvimento com Responsabilidade

# Cursos profissionalizantes a distância.

Você faz seu horário - Flexibilidade de lugar - Acompanhamento individual

## **Matrículas abertas!**

Cursos Técnicos | Qualificação | Aperfeiçoamento Profissional

Telefone: (62) 3269-1200 ou (62) 3902-6200

[www.senaigo.com.br](http://www.senaigo.com.br)

