UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de
2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas
frente à cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*.

Leonardo Viana de Almeida

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares

São Paulo

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de
2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas
frente à cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*.

Leonardo Viana de Almeida

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares

São Paulo

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Almeida, Leonardo Viana de
A447s Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de
2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-
1,3,4-oxadiazolinas frente à cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus*
aureus. / Leonardo Viana de Almeida. -- São Paulo, 2008. 135p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Tavares, Leoberto Costa

1. Química médica 2. Relações estrutura-atividade (SAR) :
Química farmacêutica 3. Fármacos : Planejamento : Química
farmacêutica 4. Quimioterápicos : Química farmacêutica I. T.
II. Tavares, Leoberto Costa, orientador.

615.19 CDD

Leonardo Viana de Almeida

Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de
2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas
frente à cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares
Orientador / presidente

Profa. Dra. Andrea Masunari
1º. examinador

Profa. Dra. Veni Maria Andres Felli
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

RELATÓRIO DE DEFESA

Aluno: 9135 - 2959789 - 1 / Página 1 de 1

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Leonardo Viana de Almeida no Programa de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 12 dias do mês de fevereiro de 2009, no(a) Auditório realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Leonardo Viana de Almeida, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

"Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas frente à cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da Unidade	Resultado
Leoberto Costa Tavares	Presidente	FCF - USP	Aprovado
Veni Maria Andres Felli	Titular	FCF - USP	Aprovado
Andrea Masunari	Titular	UnABC - Externo	Aprovado

Resultado Final: Aprovado

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Mirian Bernardes Lopes Alves _____, lavrei o presente relatório, que assino juntamente com os(as) Senhores(as) examinadores. São Paulo, aos 12 dias do mês de fevereiro de 2009.

Veni Maria Andres Felli

Andrea Masunari

Leoberto Costa Tavares

Presidente da comissão julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

O título foi homologado pela Comissão de Pós-Graduação em 17/02/2009 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestre em Tecnologia Bioquímico obtido no Programa Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Área de concentração: Tecnologia Químico-Farmacêutica.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	2
3. OBJETIVO	4
4. REVISÃO DA LITERATURA	6
4.1. Resistência Bacteriana.....	6
4.1.1. Mecanismo de resistência bacteriana.....	7
4.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
4.2. Propriedades físico-químicas que influenciam a atividade de fármacos.....	12
4.2.1. Interações fármaco-receptor.....	12
4.2.2. Propriedades físico-químicas.....	16
4.2.2.1. Hidrofobicidade e parâmetros relacionados.....	17
4.2.2.2. Distribuição eletrônica e parâmetros relacionados.....	22
4.2.2.3. Volume molecular e parâmetros relacionados.....	27
4.3. Relação estrutura-atividade biológica.....	33
4.4. Nitro-compostos.....	37
4.4.1. Nitro-compostos empregados na terapêutica antimicrobiana.....	39
4.4.2. Mecanismo de ação antimicrobiana de nitro-compostos.....	42
4.4.3. Compostos oxadiazolínicos com atividade antimicrobiana.....	46
5. MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1. Reagentes, solventes e substâncias utilizadas.....	48
5.2. Equipamentos.....	48
5.3. Microrganismo e meios de cultura.....	49

5.4. Síntese, extração e purificação dos compostos.....	50
5.5. Análise de identificação estrutural e pureza.....	52
5.6. Determinação da atividade antimicrobiana.....	53
5.7. Preparo do inóculo.....	56
5.8. Determinação da concentração bactericida mínima.....	57
5.9. Determinação do número de unidades formadoras de colônia.....	57
6. RESULTADOS.....	59
6.1. Síntese dos compostos.....	59
6.2. Identificação estrutural e pureza dos compostos.....	61
6.3. Atividade antimicrobiana.....	72
7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	73
7.1. Síntese e identificação estrutural dos compostos.....	73
7.2. Ensaio microbiológico.....	77
7.3. Estrutura química e atividade antimicrobiana.....	80
7.3.1. Influência da hidrofobicidade.....	83
7.3.2. Influência da distribuição eletrônica.....	86
7.3.3. Influência do volume molecular.....	87
7.4. Conclusões.....	89
7.4.1. Síntese.....	89
7.4.2. Ensaio microbiológico.....	89
8. PERSPECTIVAS.....	90
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
10. Anexos	
ANEXO 1. Estruturas químicas e espectros.....	98
ANEXO 2. Informações para os Membros de Bancas Julgadoras.....	131
ANEXO 3. Ficha do Aluno – FenixWeb.....	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução da resistência do <i>Staphylococcus aureus</i>	11
Figura 2: Interações fármaco-receptor. 1. dipolo-dipolo. 2. hidrofóbica aromática. 3. estéreo-química. 4. hidrofóbica alifática. 5. ponte de hidrogênio.....	15
Figura 3: Modelo de compartimentos para absorção, distribuição e eliminação de fármacos.....	19
Figura 4: Efeito eletrônico de substituintes sobre o deslocando a constante de equilíbrio ácido/base.....	23
Figura 5: Estrutura do biciclo-[2,2,2]-octano-1-carboxílico <i>para</i> -substituído e quinuclidina <i>para</i> -substituída.....	25
Figura 6: efeito estéreo-químico de grupos na hidrólise ácida e básica de ésteres substituídos.....	30
Figura 7: raios moleculares de substituintes simétricos AB_3	31
Figura 8: Definição dos eixos e dimensões dos parâmetros de esterimol.....	31
Figura 9: Definição da sexta dimensão dos parâmetros de esterimol.....	32
Figura 10: Efeito estéreo-químico na polarizabilidade de ácido benzóicos <i>orto</i> -substituídos.....	33
Figura 11: Diagrama de Craig, dispersão das constantes de Hansch e Hammett de grupos substituintes.....	36
Figura 12: Compostos 2-nitro-furanos 5-substituídos (Dodd, M.C. et al., 1944).....	37
Figura 13: Compostos 2-nitro-aromáticos 5-substituídos (Gayral, M.C., et al., 1981).....	38
Figura 14: Compostos 2-nitro-tiofeno 5-substituídos (Delmas, F., et al., 1993).....	39
Figura 15: Estrutura química da nitrofurantoína.....	39
Figura 16: Estruturas químicas do metronidazol e nifuroxazida.....	40
Figura 17: Estruturas químicas do nifurtimox e megazol.....	42
Figura 18: Ciclo de oxi-redução de nitro-compostos e ações deletérias.....	43
Figura 19: Vias de metabolização aeróbia e anaeróbia de nitro-compostos e ações deletérias.....	45
Figura 20: Estrutura química e atividade antimicrobiana de compostos 2,3-diidro- 1,3,4-oxadiazolínicos (Rollas, S., 2002).....	46

Figura 21: Mecanismo de reação proposto para ciclização do anel 2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínico.....	47
Figura 22: Rota sintética para obtenção dos compostos 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos.....	50
Figura 23: Procedimento de determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	55
Figura 24: Foto das micro-placas do ensaio microbiológico.....	78
Figura 25: Procedimento de adição de solução de indicador de pH, púrpura de bromocresol, antes e após visualização da mudança de coloração. Incubação por 18 h.....	78
Figura 26: Concentração inibitória mínima. Teste com 18 horas de incubação e adição de púrpura de bromocresol como indicador de pH. Visualização lateral e horizontal.....	79
Figura 27: Disposição das constantes de Hansch e Hammett dos grupos substituintes.....	82
Figura 28: Tendência de correlação entre constante de Hansch e atividade antimicrobiana dos compostos alquílico e alcoílicos substituídos.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Faixa de fusão e rendimento da última etapa de síntese de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	60
Tabela 2: Análise Elementar de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	62
Tabela 3: Sinal de RMN- ¹ H (ppm) em DMSO-d ₆ de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	64
Tabela 4: Sinal de RMN- ¹³ C (ppm) em DMSO-d ₆ de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	67
Tabela 5: Número de Onda, em cm ⁻¹ , do espectro de absorção na Região do Infra-Vermelho de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	70
Tabela 6: Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-substituído-fenil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	72

Tabela 7: Variações reacionais da etapa de ciclização para formação do composto 2-[nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-etil-fenil]- 2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínico em anidrido acético (proporção 1:100 (peso/volume) tempo de refluxo 1,5 - 2 h).....	76
Tabela 8: Concentrações Inibitórias Mínimas 18 h versus Parâmetros hidrofóbicos, eletrônicos e estereo-químicos de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	81

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AB: atividade biológica

B₁, B₂, B₃, B₄, B₅: dimensões de esterimol

ATCC: *American Type Culture Collection*

CBM: concentração bactericida mínima

CIM: concentração inibitória mínima

ClogP: coeficiente de partição calculado pelo programa *ClogP Program 4.0*

°C: grau Celsius

DMF: dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DMSO-d₆: dimetilsulfóxido deuterado

E_S: constante estérica de Taft

E_S^C: constante estérica de Taft corrigida

E_σ: constante de grupo representante apenas do efeito polar

FAD

g: grama

IV: infra-vermelho

K: constante de equilíbrio de reação química

K_x: constante de equilíbrio de reação química para o composto substituído

K₀: constante de equilíbrio de reação química para o composto não substituído

L: litro

L: dimensão L de esterimol

Log(1/C): potência antimicrobiana

m: metro

MIC: *Minimum inhibitory Concentration*

MRSA: *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

NADP:

P: coeficiente de partição

ppm: partícula por milhão

PCA: *Plate Count Agar*

RMN-¹H: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio¹

RMN-¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de carbono¹³

TMS: trimetilsilano

TSB: *Trypic Soy Broth*

UFC: unidade formadora de colônia

UV: ultra-violeta

VISA: *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*

σ : constante de Hammett

σ_p : constante de Hammett na posição *para*

σ_m : constante de Hammett na posição *meta*

σ_i : constante de Hammett de efeito indutivo

σ_R : constante de Hammett de efeito de ressonância

π : constante de Hansch

ρ : constante de reação

μ : micro, 10^{-6}

$\mathcal{F}$: constante de campo de Swain & Lupton

$\mathcal{R}$: constante de ressonância de Swain & Lupton

Δ : aquecimento

RESUMO

A introdução de um grupo substituinte na molécula de um fármaco promove alterações químico-estruturais que, por sua vez, modificam suas propriedades físico-químicas. O arranjo espacial de átomos ou grupos de átomos, em especial grupos funcionais, na molécula de um fármaco, expressos por meio de suas propriedades físico-químicas, influenciam direta ou indiretamente na interação fármaco-receptor. Esta, por sua vez, determina aspectos farmacológicos e farmacocinéticos que influem na eficácia terapêutica do medicamento. Assim, uma série de compostos 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos foi planejada e os análogos foram sintetizados, identificados estruturalmente e avaliados *in vitro* quanto a atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 25923), expressa pela determinação da concentração inibitória mínima. Cepas desta bactéria são comuns em infecções hospitalares e frequentemente apresentam caráter de multi-resistência, portanto, alternativas aos fármacos comumente empregados na terapia antibacteriana, especialmente em infecções multi-resistentes, são alvo de estudos e desenvolvimento.

Relações entre mudanças estruturais de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas e suas respectivas concentrações inibitórias mínimas podem fornecer informações sobre a influência de propriedades físico-químicas na ação antibacteriana destes compostos, informações estas que podem contribuir para o entendimento das relações entre a estrutura química e a atividade biológica desta classe de compostos, visando a identificação qualitativa e quantitativa das propriedades físico-químicas que influenciam no perfil farmacológico desta classe de compostos.

Os grupos substituintes introduzidos nos derivados de 2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas-2,3,5-substituídas contribuem para alterações em suas propriedades físico-químicas, sendo representadas por parâmetros físico-químicos que descrevem a natureza e intensidade da alteração observada. O presente trabalho objetivou identificar, partindo das propriedades físico-químicas, fatores da estrutura química que favoreçam a atividade antimicrobiana dos compostos estudados.

A atividade antimicrobiana, expressa pela concentração inibitória mínima, foi determinada pelo procedimento de microdiluição sucessiva, no qual diferentes

concentrações de composto a ser analisado foram incubadas em presença de inóculo de *Staphylococcus aureus*, em meio de cultura líquido. As microdiluições originam concentrações decrescentes a fim de se determinar a menor concentração do composto testado onde o crescimento microbiano foi inibido.

Foram realizadas comparações entre as concentrações inibitórias mínimas dos compostos analisados e destas com parâmetros estruturais que representam as propriedades físico-químicas dos compostos. Baseado nas análises comparativas, identificou-se tendências que evidenciam a preponderância de propriedades físico-químicas sobre a atividade antimicrobiana desempenhada.

Constatou-se que a hidrofobicidade influi significativamente na atividade antimicrobiana. Observou-se também que o efeito eletrônico por indução e o volume do grupo substituinte em posição *para*-fenila também influenciam a ação antimicrobiana, mas estas ainda não foram conclusivas, carecendo de estudos mais aprofundados que levem à compreensão dos fatores estruturais que mais influenciam a ação antimicrobiana de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas, de forma a fundamentar o planejamento de futuros candidatos a fármacos antimicrobianos a partir desta classe de compostos.

ABSTRACT

The introduction of a substitute group within a drug molecule promotes chemical-structure shifts, which by consequence, alters its physical-chemical properties. The atomic special design, particularly the one related to functional groups, assumed in a drug molecule, expressed by the physical-chemical properties, interferers directly or indirectly on drug-receptor interaction. Theses effects collaborate to pharmacologic and pharmacokinetics aspects of drugs, interfering with its therapeutic efficient. Therefore, a set of 2-[5-nitro-thiophen-2-yl]-3-acetyl-5-[4-substitued-phenyl]-3,4-dihydro-1,3,4-oxadiazolines compounds was designed and its analogs synthesized, structurally identified, and *in vitro* assayed due to its antimicrobial activity against ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* strains, through the determination of minimum inhibitory concentration. Strains of such bacterial species are commonly present within hospital infections, and frequently appear as multi-resistant variant. Consequently, alternatives to the agents usually applied in antimicrobial chemotherapy, particularly to multi-resistant infections, are target for drug research and development.

Relations among structural shifts on 2-[5-nitro-thiophen-2-yl]-3-acetyl-5-[4-substitued-phenyl]-3,4-dihydro-1,3,4-oxadiazolines compounds and its respective minimum inhibitory concentration may lead to information about the influence of physical-chemical properties in antimicrobial activity. Continually, such information might contribute to the elucidation of chemical structure-biological activity relationship of these compounds.

The substitutes groups inserted on 2,3,5-substitued-3,4-dihydro-1,3,4-oxadiazolines derivates contribute to differs the molecule physical-chemical properties, which is represented by its physical-chemical parameters, which describe the nature and intensity of the observed modification. Therefore, the following study aimed to identify, throughout physical-chemical properties, chemical structure factors that favor the antimicrobial activity of the synthesized compounds.

The antibacterial activity, expressed as the minimum inhibitory concentration, was quantified by the microdilution method, where gradual concentrations of the tested conpound were incubated within ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* cells suspended in broth medium. The microdilutions originated descending

concentrations, in order to spot the minimum concentration whose microbial growth was inhibited.

The minimum inhibitory concentration regarded to each compound was correlated to its physical-chemical parameters. Based on observed relations, it could be identified evidences assuming the physical-chemical properties relevance on antimicrobial assay.

It was verified that hydrophobic effects interferes with antimicrobial activity, as well as inductive electronic effects and molecular volume of substitute group in *para*-phenyl position. These factors contribute to physical-chemical properties shifts and therefore play a role on the antimicrobial action. However, these latest two influences were enable to conclude, suggesting the need of more extensive studies. So that, a more profound comprehension about structure factors that interfere with 2,3,5-substitued-3,4-dihydro-1,3,4-oxadiazolines derivates might lead to the rational design of potential antimicrobial agents among this class of compounds.

1. INTRODUÇÃO

A terapia antimicrobiana encontra-se sob constante pressão de seus agentes etiológicos provinda da contínua queda de eficácia dos agentes antimicrobianos, uma vez que mecanismos naturais de adaptação, presentes em qualquer espécie biológica, atuam por induzir resistência aos microrganismos alvos da quimioterapia antimicrobiana (Patrick, L., 2001; Rang, H. P., 2001; Trabulsi, L. R., et al., 2002).

Visto este contexto, a pesquisa por novos agentes antimicrobianos se torna uma questão de urgência dentre as maiores necessidades médicas atuais. A ineficácia crescente da terapêutica antimicrobiana se disseminou como desafio na Saúde Pública desde a introdução dos primeiros antibióticos, como o caso das primeiras penicilinas naturais e, posteriormente as semi-sintéticas, em meados do século XX, e atualmente, a ineficácia terapêutica mútua para diversos antibióticos e antimicrobianos, chamada de multi-resistência, é observada comumente em cepas patogênicas originando um problema de grande relevância médica, altamente presente em infecções hospitalares, especialmente estafilocócicas (Trabulsi, L.R., et al., 2002).

A introdução de compostos nitro-heterocíclicos aromáticos como agentes quimioterápicos, em especial com atividade antimicrobiana, desde a década de 1940, possibilitou grandes avanços terapêuticos, cujos empregos permanecem até a atualidade, como o caso do metronidazol (Goodman, A. G., et al., 2000).

Compostos nitro-aromáticos, em particular, nitro-furânicos e nitro-tiofênicos apresentam relevante atividade antimicrobiana frente a cepas bacterianas e parasitárias, inclusive aquelas de caráter de multi-resistência (Rezende, P., 2002; Masunari, A., 2005, 2006; Reisdorfer, F., 2007).

Grandes vantagens são verificadas durante o planejamento e desenvolvimento racional de fármacos pré-existentes. Estas decorrem, entre outros fatores, do prévio conhecimento de suas ações terapêuticas e adversas e respectivos mecanismos de ação, bem como perfil farmacocinético, portanto, antimicrobianos nitro-aromáticos se mostram como plausíveis protótipos para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico, cuja compreensão das propriedades físico-químicas interferentes na ação antimicrobiana pode direcionar a pesquisa de novos agentes quimioterápicos.

2. JUSTIFICATIVA

A procura por novos agentes antimicrobianos é objeto de contínua pesquisa na Química Medicinal, visto que o arsenal terapêutico antimicrobiano, apesar de extenso, converge para um universo limitado, dado pela ineficácia progressiva de seus agentes farmacológicos,.

A queda da ação terapêutica antibióticos e antimicrobianos decorre tanto em função do desenvolvimento de mecanismos bioquímicos de resistência microbiana aos fármacos comumente empregados, como pelas freqüentes inadequações na indicação e/ou dose terapêutica. Estes dois fatores estão intimamente relacionados e têm resultado na emergência de grande número de microrganismos patogênicos resistentes a diversos agentes antimicrobianos de uso corrente. Em particular, se destaca o *Staphylococcus aureus* cuja disseminação prevalece em ambiente hospitalar, sendo causador de infecções graves, inclusive com caráter de multi-resistência, e com diversos graus de complicação (Trabulsi, L.R., et al., 2002).

Visto que compostos nitro-heterocíclicos aromáticos apresentam baixa capacidade de indução à resistência microbiana, o desenvolvimento de novos nitro-compostos proporciona alternativas viáveis frente a crescente problemática da resistência microbiana (Goodman, A. G., et al., 2000; Masunari, A., 2005, 2006).

Estudos recentes com compostos análogos à nifuroxazida, um derivado nitro-furânico, demonstraram alta atividade antimicrobiana frente a cepa padrão de *Staphylococcus aureus*, inclusive frente a cepas com caráter de multi-resistência como MRSA e VISA. Portanto, estudos subseqüentes com compostos nitro-heterocíclicos aromáticos de estrutura química semelhante à nifuroxazida são possíveis alvos no planejamento de novos agentes antimicrobianos (Rezende, P., 2002; Masunari, A., 2005, 2006).

Modificações estruturais na molécula de fármacos alteram sua configuração molecular e, conseqüentemente, suas propriedades físico-químicas. Essas mudanças promovem alterações tanto na interação fármaco-receptor como em aspectos farmacocinéticos que, somados, podem provocar grandes alterações no perfil terapêutico (Patrick, L, 2001; Hansch, C., 1995).

A compreensão acerca da influência de fatores estruturais e físico-químicos na atividade antimicrobiana pode auxiliar no planejamento de análogos mais ativos,

menos tóxicos ou com melhor perfil farmacológico, subsidiando o desenvolvimento de alternativas terapêuticas. Assim, a introdução de grupos substituintes em moléculas utilizadas como fármacos, seguida da determinação da atividade biológica de seus análogos, possibilita ampla perspectiva de estudos relacionados com propriedades físico-químicas, representadas quantitativamente por seus parâmetros descritores, que influenciam a atividade observada (Hansch, C., 1995; Wermuth, C., 2003; Masunari, A., 2005, 2006).

Neste sentido, o presente trabalho propõe o planejamento, a síntese e identificação estrutural e a determinação da atividade antimicrobiana, assim como o estudo das relações estrutura-atividade de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-R-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas, onde R = H, Cl, I, CF₃, CH₃, C₂H₅, C₃H₇, OCH₃, OC₂H₅, OC₃H₇, CH(CH₃)₂.

3. OBJETIVO

A quimioterapia antimicrobiana constantemente necessita de alternativas frente a crescente incidência de microrganismos resistentes. Frente a essa necessidade, e visto que compostos nitro-heterocíclicos apresentam baixa capacidade de indução de resistência microbiana (Goodman, A. G., et al., 2000; Masunari, A., 2005, 2006), o presente trabalho se propõe a modificar a estrutura química da nifuroxazida (1), um derivado nitro-furânico, na busca de identificação de aspectos estruturais que possam alterar as propriedades físico-químicas da molécula que influenciam a atividade antibacteriana para, em etapa subsequente, possibilitar o planejamento de análogos estruturais mais potentes e/ou mais seguros para aplicação na terapêutica antimicrobiana.

A modificação estrutural molecular empregada no presente trabalho está baseada na substituição da hidroxila fenólica em posição *para*-fenólica da molécula da nifuroxazida, com o objetivo de provocar mudanças nas propriedades físico-químicas que condicionam a atividade desta classe de compostos. A modificação estrutural planejada se baseia na constatação de que compostos nitro-furânicos (2), de estrutura semelhante, e igualmente *para*-fenílicos substituídos apresentaram atividade antibacteriana, frente a cepas Gram positivas e Gram negativas, bem como atividade anti-fúgica (Rollas, S., 2002). Estes compostos (2) possuem anel 3-acetil-2,3,-diidro-1,3,4-oxadiazolínico resultante da ciclização da porção azometínica presente na molécula da nifuroxazida, o que altera significativamente o perfil estrutural e, conseqüentemente, o perfil físico-químico dos compostos planejados em relação à nifuroxazida, considerado como composto padrão.

As figuras acima ilustram as estruturas químicas da nifuroxazida (1), do composto 2-[5-nitro-furan-2-il]-3-acetil-5-[4-fluor-fenil]-2,3,-diidro-1,3,4-oxadiazolínico (2), de atividade antimicrobiana constatada (Rollas, S., 2002), e dos compostos 2-[5-

nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínico (3), que são o objeto de síntese, identificação estrutural e determinação da atividade antibacteriana deste trabalho.

Ademais, através da avaliação da atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-R-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas, em que R = H, Cl, I, CF₃, CH₃, C₂H₅, C₃H₇, OCH₃, OC₂H₅, OC₃H₇, CH(CH₃)₂, também se constitui como objetivo deste trabalho o entendimento das bases das relações entre a estrutura química e a atividade antimicrobiana da série de compostos estudada.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. RESISTÊNCIA BACTERIANA

O termo quimioterapia é definido pelo uso de compostos químicos sintéticos (antimicrobianos), naturais ou semi-sintéticos para eliminar agentes infecciosos ou parasitários, sendo também aplicado no combate à células neoplásicas. A ação destes compostos se baseia no princípio da seletividade, pelo menos dentro de uma faixa de concentração. Esta seletividade deriva de diferenças bioquímicas entre o metabolismo de microrganismos, parasitas ou células neoplásicas (Rang, H.P., et al., 2001).

Organismos procariotas, como as bactérias, possuem diferenças metabólicas, muitas vezes marcantes em relação aos organismos eucariotas, com destaque para as células de mamíferos (Rang, H.P., et al., 2001). A diferença mais marcante entre células eucarióticas e células bacterianas está relacionada com a presença de parede celular nestas últimas. Células bacterianas estão amplamente distribuídas podendo, muitas vezes, suportar grandes variações do meio ambiente. Uma outra grande diferença é o fato de células bacterianas não possuírem núcleo definido e a terceira maior diferença se relaciona com a presença de sub-estruturas celulares com diferenças funcionais e anatômicas em relação às células eucarióticas, como a mitocôndria, que nas células bacterianas é mais simplificada (Patrick, L.G., 2001).

Acompanhando as grandes diferenças nas estruturas celulares, encontram-se grandes diferenças bioquímicas que, muitas vezes, são exploradas dando margem para o estabelecimento dos mecanismos de ação de agentes antimicrobianos ou antibióticos (Rang, H.P., et al., 2001; Trabulsi, L.R., et al., 2002). Estes mecanismos de ação atuam em três grandes grupos de reações bioquímicas; e são eles: utilização de glicose ou outra fonte de carbono para obtenção de energia; utilização da energia gerada para construção de moléculas pequenas e utilização de moléculas pequenas para construção de macro-moléculas, que constituem a anatomia do microrganismo (Rang, H.P., et al., 2001; Trabulsi, L.R., et al., 2002). Expandindo estes três grupos do metabolismo de microrganismos, podemos alocar os agentes antimicrobianos na seguinte classificação, esta de maior relevância histórica:

1- agentes que inibem a biossíntese ou ativam enzimas que degradam a parede bacteriana, causando perda de estabilidade e resultando em lise celular. Nesta classe, encontra-se o grupo das penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas e outros derivados β -lactâmicos, e ainda outros antibióticos como a vancomicina, a bacitracina e alguns agentes anti-fúngicos como o miconazol e cetoconazol;

2- agentes que agem diretamente na membrana celular de microrganismos alterando sua permeabilidade;

3- agentes que inibem ou alteram a síntese protéica; agentes que afetam o metabolismo de ácidos nucléicos e funções correlatas;

4- agentes anti-metabólicos que bloqueiam reações bioquímicas específicas, como a inibição da síntese de ácido fólico por sulfonamidas e trimetoprima;

5- agentes que mimetizam unidades de ácidos nucléicos, como os anti-retrovirais, e restando ainda, aqueles agentes que atuam por mecanismos pouco conhecidos (Goodman, A.G., et al., 2000; Rang, H.P., et al., 2001; Trabulsi, L.R., et al., 2002).

4.1.1. MECANISMO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

As bactérias podem ser classificadas em sensíveis ou resistentes aos agentes antimicrobianos ou antibióticos. A resistência pode ser definida pela ocorrência de cepas bacterianas que não respondem à ação esperada do agente antimicrobiano na faixa de concentração considerada segura para seu uso terapêutico. Esta definição é passível de flexibilização, uma vez que as concentrações acima das quais se considera evento de resistência podem ser arbitrárias (Goodman, A.G., et al., 2000). A resistência pode ser natural ou adquirida, sendo a natural uma característica intrínseca da espécie bacteriana em que todas as cepas são resistentes, independente do local onde foram isoladas. Por outro lado, a resistência adquirida deriva da ocorrência de cepas isoladas que possuem esta característica incomum da espécie. A resistência de *Escherichia coli* à benzilpenicilina é exemplo de resistência natural, enquanto cepas desta mesma espécie podem apresentar resistência adquirida à ampicilina (Trabulsi, L.R., et al., 2002).

O uso de agentes antimicrobianos na terapêutica ou *in vitro*, por si só, não implica a ocorrência de resistência ao mesmo, mas pode resultar em fator seletor. A

aquisição de resistência a agentes antimicrobianos envolve alterações genéticas do microrganismo e, por consequência, alterações em sua expressão bioquímica (Goodman, A.G., et al., 2000; Trabulsi, L.R., et al., 2002).

A resistência bacteriana constitui desafio contínuo na química medicinal e na quimioterapia (Rang, H.P., et al., 2001; Goodman, A.G., et al., 2000; Trabulsi, L.R., et al., 2002). Bactérias são microrganismos cujo material genético encontra-se em processo contínuo de alterações, propiciando o surgimento de variações resistentes dentro de um ambiente seletor (Trabulsi, L.R., et al., 2002). As alterações genéticas podem ser decorrentes de mutações cromossômicas ou por aquisição de genes ou parte deles, resultando na resistência ao agente antimicrobiano (Trabulsi, L.R., et al., 2002).

Bactérias se multiplicam rapidamente, aumentando a chance de ocorrência de mutações naturais e randômicas que levem à resistência aquele agente antimicrobiano, mesmo antes do seu emprego. Este evento foi demonstrado pelo isolamento de células resistentes à estreptomicina de culturas de *Echerichia coli* liofilizadas antes da introdução deste agente na terapêutica (Patrick, G.L., 2001).

A resistência bacteriana adquirida por transferência de material genético, constitui outro meio deste evento, dada a facilidade de troca de informações genéticas de uma célula bacteriana para outra, sendo transdução e conjugação, os mecanismos mais comuns para esta troca (Patrick, G.L., 2001). No primeiro, pequenos fragmentos anelares de material genético, chamados de plasmídeos, são transferidos por vetores, bacteriófagos ou vírus de bactérias, que infectam células resistentes carregando informações para células sensíveis (Patrick, G.L., 2001; Trabulsi, L.R., et al., 2002). Dentro deste mecanismo observa-se a troca do gene para produção de enzimas que clivam antibióticos beta-lactâmicos, como as beta-lactamases (Patrick, G.L., 2001). Este mecanismo bioquímico de resistência tem grande importância histórica. Logo após a introdução terapêutica da primeira penicilina (penicilina G) na década de 40, cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes surgiram, se tornando grave problema de saúde no ambiente hospitalar e na comunidade. Atualmente cerca de 80% das cepas são resistentes a este agente (Goodman, A.G., et al., 2000). Recentemente, a resistência a antibióticos beta-lactâmicos se expandiu para todos antibiótico desta classe, sendo que cepas que apresentam esta característica também são chamadas de *Staphylococcus aureus*

resistente à metilicina (MRSA). Todavia, o mecanismo bioquímico deste tipo de resistência não é integralmente conhecido, sendo relacionado a um conjunto de genes cromossômicos especiais, vinculados a alterações nas proteínas receptoras de penicilinas, PBP (Trabulsi, L.R., et al., 2002).

No segundo processo de transferência de material genético, chamado de conjugação, ocorre pela troca direta de material genético entre células bacterianas, evento comum para bactéria Gram-negativas, dado por meio de pilus, filamentos da membrana celular que promovem o contato entre células (Patrick, G.L., 2001).

Os mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência bacteriana são variáveis, sendo a produção de enzimas que modificam a parte ativa do composto antimicrobiano o mais comum. Outro mecanismo de grande interesse provém da capacidade de microrganismos sintetizarem receptores alvo de antimicrobianos ou antibióticos que não respondendo à ação esperada dos quimioterápicos. Demais mecanismos incluem a diminuição da permeabilidade de células bacterianas às moléculas do fármaco; produção de novas enzimas na cascata metabólica na qual age o antimicrobiano; efluxo da molécula do antimicrobiano do interior da célula, e alguns outros mecanismos permanecem pouco conhecidos (Trabulsi, L.R., et al., 2002).

4.1.2. *Staphylococcus aureus*

Algumas espécies bacterianas têm importância particular no se refere à resistência adquirida, entre elas destaca-se o gênero *Staphylococcus*, susceptível à ação de diversos fármacos. O *Staphylococcus aureus* é responsável por grande percentual de infecções adquiridas principalmente em ambientes hospitalares (Chambers, H.F., 1988; Goodman, A.G., et al., 2000; Sievert, D.M., 1996; Trabulsi, L.R., et al., 2002).

Os estafilococos são cocos Gram-positivos amplamente distribuídos na natureza, pertencendo à microbiota natural da pele e mucosa de aves e mamíferos. Este gênero possui cerca de 27 espécies, muitas das quais estão relacionadas às infecções humanas, geralmente de caráter oportunista, destacando-se as espécies *aureus*, *epidermidis*, *saprophyticus* e *haemolyticus* (Trabulsi, L.R., et al., 2002).

Staphylococcus aureus resistentes pode ser transmitidos entre pacientes dentro do ambiente hospitalar, por contato direto ou indireto. As infecções podem se tornar graves se acometerem pacientes com defesas imunológicas comprometidas ou ainda não totalmente desenvolvidas como os recém-nascidos, os pacientes cirúrgicos ou portadores de próteses, pacientes submetidos a cateteres ou enxertos sintéticos, acidentados por traumas físicos, queimados, portadores de doenças debilitantes como câncer, AIDS, diabetes ou sob terapia imunossupressora. Entre as infecções mais graves podem-se destacar osteomielite, bacteremia, endocardite, pneumonia, meningite e artrite bacteriana (Trabulsi, L.R., et al., 2002).

Após a eclosão de cepas de *Staphylococci* resistentes à benzilpenicilina, foram desenvolvidas penicilinas semi-sintéticas, tais como meticilina, oxacilina, nafcilina e cloxacilina, resistentes à ação de penicilases, iniciando-se uma nova fase na antibioticoterapia em 1959, o que representou grande avanço na eficácia da terapia anti-estafilocócica. Cerca de dois anos depois, todavia, foram observadas infecções resistentes às penicilinas semi-sintéticas, sendo que cepas resistentes a meticilina se espalharam rapidamente por diversas regiões do mundo, ocasionando surtos de infecções com caráter de multi-resistência. Ademais às penicilinas, outro antibiótico de importância na resistência estafilocócica é a gentamicina e, atualmente, o antibiótico de escolha no tratamento de infecções estafilocócicas com caráter de resistência ou de multi-resistência é a vancomicina (Trabulsi, L.R., et al., 2002).

De acordo com artigo-alerta do CDC – Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA, a resistência bacteriana é uma das maiores preocupações da Saúde Pública em âmbito mundial, sendo observada mudança no perfil epidemiológico de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, tornando-se menos susceptível à vancomicina (Clifford, L. M., 2006).

Há prevalência de infecções hospitalares em relação às infecções comunitárias, salientando-se a preocupação com grande incidência de resistência bacteriana dentro do ambiente hospitalar. Uma infecção é considerada de origem hospitalar se adquirida após 48 horas ou mais do momento da internação, ou mesmo se aparecer dentro de 30 dias após saída da unidade hospitalar. A evolução da resistência de *Staphylococcus aureus* a diversos antibióticos é apresentada na figura 1 (Clifford, L. M., 2006).

Figura 1: Evolução da resistência do *Staphylococcus aureus*. Quadrado escuro: infecção nosocomial. Quadrado Cinza: infecção comunitária.
(Clifford, L. McDonald. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA. Trends in Antimicrobial Resistance in Health Care, v. 42, p. 65-71 (Suppl 2), 2006).

Têm-se observado, mais recentemente, que bactérias Gram-negativas também têm causado preocupações pelo surgimento e disseminação de resistência bacteriana. Dados coletados em centros hospitalares nos EUA entre 1994 e 2004 mostram a emergência de variações de resistência de diversas cepas Gram-negativas (Clifford, L. M., 2006).

Cepas de bactérias isoladas de solos de áreas com histórico de amplo uso de fertilizantes e produtos para alimentação animal, que comumente contêm antimicrobianos e antibióticos, apresentaram não somente resistência a vários tipos de antibióticos e antimicrobianos, como mas também foram capazes de assimilar esses fármacos como única fonte de carbono. Entre as cepas isoladas e estudadas, foram identificados alguns gêneros com potencial patogênico, como *Pseudomonas*, *Enterobacterium*, *Actinomyces*, *Rhizobias* e *Sphingobacterium*, o que revela a abrangência da resistência bacteriana (Dantas, G., et al., 2008).

4.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS QUE INFLUENCIAM A ATIVIDADE DE FÁRMACOS

4.2.1. INTERAÇÕES FÁRMACO-RECEPTOR

O efeito farmacológico entre fármaco e seu respectivo sítio de ação, na biofase, depende de interações intermoleculares e, possivelmente, intramoleculares (Barreiro, E. J., 2001; Silverman, R.B., 2004).

A resposta farmacológica deriva de influências químicas que moléculas do fármaco exercem sobre a biofase, através de um sítio de ação, resultando em uma resposta farmacológica. Para um fármaco ter finalidade terapêutica, ele deve atuar seletivamente sobre determinadas células ou tecidos (Rang, H.P., et al., 2001). As interações fármaco-receptor são constituídas por forças que se estabelecem entre átomos ou grupo de átomos. As interações envolvidas no complexo fármaco-receptor são as mesmas que ocorrem entre quaisquer moléculas orgânicas, e podem ser de diferentes naturezas, como as forças eletrostáticas, as interações íon-dipolo ou dipolo-dipolo, as pontes de hidrogênio, as transferências de carga, as interações hidrofóbicas e as força de Van der Waals. Enclui-se, também, a formação de nova ligação covalente sendo, porém, mais raro na interação fármaco-receptor (Gringauz, A., 1997; Rang, H.P., et al., 2001; Silverman, R.B., 2004).

Todas as interações moleculares são regidas pelas leis da termodinâmica. A primeira lei estabelece que a energia não pode ser criada nem destruída, apenas transferida de um sistema para outro, enquanto a segunda lei da termodinâmica restringe esta troca de energia, onde a variação de entalpia (energia total do sistema) é igual à soma da variação da energia livre de Gibbs (porção de energia convertível em trabalho, ΔG^0) mais o produto da temperatura absoluta do sistema multiplicado pela entropia (porção de energia não convertível em trabalho, correspondente à vibração de átomos nas moléculas). A interação entre um fármaco e seu receptor envolve, portanto a troca de energia e esta, por sua vez, pode quantificar a afinidade desta interação (Korolkovas, A., 1988; Silverman, R.B., 2004). Geralmente, as ligações formadas na interação fármaco-receptor são fracas e não covalentes, resultando em interações reversíveis, assim, a atividade de um fármaco decresce à medida que decai sua concentração nas proximidades do seu sítio de ação (Silverman, R.B., 2004).

As interações íon-dipolo ou dipolo-dipolo resultam da diferença de eletronegatividade entre átomos, particularmente oxigênio, nitrogênio, enxofre, halogênios, ligados covalentemente. Em tais ligações, como carbono-oxigênio, a nuvem eletrônica que constitui a ligação é distribuída de forma assimétrica, de modo que os elétrons têm dispersão preferencial sob o átomo mais eletronegativo, neste caso, o oxigênio. Isto gera um dipolo que é atraído por cargas opostas, seja íon ou outro dipolo na molécula receptora, desde que seus opostos estejam alinhados espacialmente. Tais interações provêm energia livre de -1 a -7 Kcal/mol (Rang, H.P., et al., 2001; Silverman, R.B., 2004).

As ligações de hidrogênio são exemplo particular de interação dipolo-dipolo, dada pela ligação de um átomo de hidrogênio com um átomo eletronegativo, como oxigênio, nitrogênio, enxofre e flúor, com outro dipolo semelhante. A singularidade desta ligação encontra-se no átomo de hidrogênio, o único capaz de portar carga positiva em pH fisiológico permanecendo ligado covalentemente. O exemplo mais comum é visto na interação entre moléculas de água no estado líquido. Tais ligações provêm, geralmente, energia de -3 a -5 Kcal/mol (Rang, H.P., et al., 2001; Silverman, R.B., 2004).

As transferências de carga ocorrem quando há aproximação entre uma molécula, ou grupo de átomos de uma molécula, que tem propriedade receptora de elétrons, com outro par doador de elétrons, formando um complexo de troca de carga, que de fato, deriva de uma interação molecular dipolo-dipolo. Exemplos de grupos doadores de elétrons são aqueles contendo ligação π próximas de doadores de elétrons (alceno, alcinos e aromáticos substituídos), grupos contendo par de elétrons livres, como oxigênio, nitrogênio e enxofre; e exemplos de grupo receptores de elétrons são aqueles contendo ligação π próximas de substituintes que atraem elétrons (alcenos, alcinos e aromáticos substituídos) e prótons de ácidos fracos. Dentro de receptores protéicos há exemplos de grupos doadores de elétrons, tais como anel aromático da tirosina, carboxila do aspartato; e de receptores de elétrons tais como, a cisteína; outros aminoácidos agem duplamente como a histidina, o triptofano e a asparagina. A energia livre envolvida em tais interação variam de -1 a -7 Kcal/mol (Silverman, R.B., 2004).

Na ausência de polaridade eletrônica dentro de moléculas, regiões ou moléculas apolares, as moléculas de água circundantes ficam orientadas de forma

organizada, logo há diminuição de entropia neste evento, envolvendo estado de energia mais elevado. Quando duas regiões apolares, tais como duas regiões de hidrocarbonetos do fármaco e seu sítio receptor se aproximam, as moléculas de água circundantes de ambas as regiões interagem desorganizando o sistema, aumentando a entropia e decaindo a energia livre ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, $\Delta H = 0$, desconsiderando troca de calor, $\Delta S > 0$, $\Delta G < 0$, evento favorável), o que favorece a aproximação de grupos apolares, estabilizando o complexo fármaco-receptor. Esta estabilização é chamada de interação hidrofóbica, porém, não são forças de atração, e sim um favorecimento entrópico, e são de grande importância nas interações fármaco-receptor (Rang, H.P., et al., 2001; Silverman, R.B., 2004).

As forças de van der Waals, ou também chamadas de forças de Dispersão de London, resultam da somatória de atração de diversos dipolos eletrônicos temporários que se formam entre átomos sem diferença de eletronegatividade pronunciada, átomos apolares, como por exemplo, ligação carbono-hidrogênio e carbono-carbono. A densidade eletrônica em regiões apolares, oscila transientemente, ocasionando dispersões eletrônicas assimétricas. Quando uma molécula possuindo uma região com dipolos transientes se aproxima de outra, estes induzem a formação de dipolos opostos, gerando atração elétrica, que isoladamente são de baixa intensidade, -0,5 Kcal/mol, porém quando somadas entre muitos dipolos temporários, geram força significativa (Rang, H.P., et al., 2001; Silverman, R.B., 2004).

As ligações covalentes se constituem como as ligações mais fortes na interação fármaco-receptor, são exemplificadas pela inibição irreversível de enzimas por fármacos que mimetizam seu substrato, formando ligação covalente o que gera alta estabilidade no complexo fármaco-receptor, ocasionando inibição irreversível da enzima. Na terapêutica, a inibição irreversível da enzima prostaglandina sintase pela aspirina, da acetilcolinesterase por organofosforados e da peptídeglicano transpeptidase por penicilinas, são exemplos clássicos de formação de ligação covalente desativando enzimas ao mimetizarem seu substrato. Ligações não covalentes, porém de longa duração para se desfazerem, também podem ser consideradas como inibição enzimática irreversível. As ligações covalentes envolvem energia de -40 a -70 Kcal/mol (Silverman, R.B., 2004).

Dentro do universo das interações fármaco-receptor, com exceção das ligações covalentes, todas são de intensidade baixa se vistas isoladamente, entretanto, a combinação e somatórias delas promovem a prevalência do complexo fármaco-receptor, e como todas dependem de um par oposto alinhado espacialmente, percebe-se a importância da distribuição espacial destes pontos de interação, de modo que a exatidão do alinhamento destes grupos opostos confere a seletividade na interação fármaco-receptor (Barreiro, E. J., 2001; Gringauz, A., 1997; Rang, H.P., et al., 2001; Silverman, R.B., 2004). A figura 2 exemplifica e ilustra interações moleculares distintas entre um fármaco hipotético e seu respectivo receptor.

Figura 2: Interações fármaco-receptor. 1. dipolo-dipolo. 2. hidrofóbica aromática. 3. estereo-química. 4. hidrofóbica alifática. 5. ponte de hidrogênio.

Do ponto de vista da interação fármaco-receptor, esses podem ser divididos em dois grandes grupos, fármacos estruturalmente inespecíficos e estruturalmente específicos. O primeiro grupo é definido por aqueles cujos efeitos biológicos dependem única e exclusivamente de suas propriedades físico-químicas, tais como coeficiente de partição e constante de ionização. Nesta classe temos como exemplo os anestésicos gerais, por exemplo, vapores orgânicos anestésicos como o halotano e isoflurano, cujo mecanismo de ação envolve alterações na permeabilidade das membranas lipo-protéicas de células do sistema nervoso central. A interação fármaco-receptor, neste caso, se dá primordialmente por forças de van der Waals, sendo a lipossolubilidade do fármaco diretamente relacionada com sua potência anestésica. O segundo grupo, que abrange a maioria dos fármacos, é definido pela interação específica entre um sítio de uma macromolécula do organismo e o

fármaco que nela atua, sendo crucial sua estrutura química, particularmente o arranjo espacial dos grupos funcionais da molécula do fármaco, logo, uma pequena mudança em algum átomo de sua molécula pode alterar radicalmente este arranjo espacial (Barreiro, E. J., 2001).

4.2.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A interação entre um fármaco e seu receptor está sob influência da complexidade dos sistemas biológicos, presente desde a via de administração do fármaco até seu sítio de interação. Este percurso pode ser resumido pelas seguintes etapas; processo de absorção e passagem por membranas biológicas, ligação com proteínas plasmáticas, distribuição por diversos compartimentos do organismo, metabolismo e excreção. Estes processos, como um todo, determinam a velocidade de distribuição de um fármaco e sua concentração em um determinado compartimento, como por exemplo, o seu sítio de ação ou sítio de toxicidade, e são fortemente influenciados pelas propriedades físico-químicas, em especial a hidrofobicidade da molécula (Gringauz, A., 1997; Korolkovas, A., 1988; Patrick, G.L., 2001; Rang, H.P., 2001). As propriedades de uma molécula podem ser descritas quantitativamente pelos seus parâmetros físico-químicos, entre eles destacam-se a solubilidade, normalmente expressa pelo coeficiente de partição água/óleo, grau de ionização, tensoatividade; parâmetros de ressonância, efeitos indutivos e de ressonância, isosterismo, potenciais de oxi-redução, quelação, distribuição eletrônica; parâmetros estéreo-químicos, como dimensões e distâncias intramoleculares, e dimensões e distâncias entre grupos funcionais (Korolkovas, A., 1988).

Tanto a afinidade de um fármaco pelo seu receptor quanto sua atividade intrínseca estão intimamente relacionadas com sua estrutura química, sendo que modificações, mesmo pequenas, em sua molécula, como alterações isostéricas de subunidades, resultam em grandes mudanças farmacológicas (Korolkovas, A., 1988; Hansch, C., 1990; Gringauz, A., 1997; Patrick, G.L., 2001; Tavares, L., 2004).

O estudo das relações entre a estrutura química de um fármaco e sua atividade farmacológica pode embasar o planejamento e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que proporcionem melhor equilíbrio entre ação terapêutica e

tóxica, aumentar seletividade por células, tecidos ou microrganismos alvos ou por modulação de efeitos secundários, tornando-os mais aceitáveis. Pequenas modificações nas moléculas de fármacos também podem levá-los a melhores perfis farmacocinéticos (Barreiro, E. J., 2001; Patrick, G.L., 2001; Tavares, L., 2004).

A elucidação da influência da estrutura molecular no mecanismo de ação de um grupo de fármacos análogos pode identificar e até quantificar as propriedades físico-químicas que influenciam a ação do fármaco no receptor, como por exemplo, tamanho de subunidades, orientação de cargas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Barreiro, E. J., 2001).

As propriedades físico-químicas podem ser expressas por descritores estruturais ou parâmetros físico-químicos que expressam a estrutura da molécula de um fármaco. Entre estes, destacam-se três grandes grupos, a saber: parâmetros de hidrofobicidade, parâmetros eletrônicos e parâmetros estéreo-químicos (Korolkovas, A., 1988; Hansch, C., 1990; Gringauz, A., 1997; Tavares, L., 2004).

4.2.2.1. HIDROFOBICIDADE E PARÂMETROS RELACIONADOS

A solubilidade de uma molécula é medida em diferentes meios, normalmente parte-se de sistema composto por um solventes polar e um solvente apolar. A solubilidade de um fármaco, portanto, está relacionada com seu transporte desde o local de sua administração até seu sítio de ação, devendo atravessar barreiras biológicas como tecidos e compartimentos, polares e apolares, para, por fim, alcançar seu sítio de ação. As principais medidas de hidrofobicidade são o coeficiente de partição, a constante π de hidrofobicidade e parâmetros cromatográficos (Korolkovas, A., 1988; Hansch, C., 1990; Tavares, L., 2004).

O coeficiente de partição é dos um dos parâmetros mais utilizados para determinar a lipofilicidade de um fármaco (Kubinyi, H., 1976, 1993; Korolkovas, A., 1988). É definido pela razão entre a concentração da substância na fase orgânica (solvente apolar) e a concentração na fase aquosa (solvente polar), em um sistema de dois compartimentos sob condição de equilíbrio. O coeficiente de partição pode ser determinado pelo método de *shake flask* (Kubinyi, H., 1976, 1993; Hansch, C. – Leo, A., 1995), onde se emprega o n-octanol como solvente apolar devido a sua semelhança estrutural com fosfolípidos de membrana, que possuem uma porção

polar, capaz de formar pontes de hidrogênio, e outra, de comprimento maior, apolar, formando uma barreira hidrofóbica; e a água como solvente polar (Kubinyi, H., 1976, 1993; Hansch, C. – Leo, A., 1995). Outras razões por se utilizar o n-octanol como solvente apolar é justificada por ser pouco miscível em água, ser pouco volátil à temperatura ambiente, solubiliza uma ampla variedade de compostos orgânicos e é adequado para análises diretas por espectrometria na região do ultra-violeta. O sistema, como um todo, representa a interface entre membranas biológicas e o meio aquoso que as circundam (Kubinyi, H., 1976, 1993; Hansch, C., 1990; Hansch, C. – Leo, A., 1995; Tavares, L., 2004).

A hidrofobicidade de um fármaco interfere diretamente na sua farmacocinética, pois o mesmo deverá atravessar diversas barreiras biológicas, hidrofílicas e lipofílicas, antes de atingir seu alvo de ação. Uma vez que a estrutura química da maioria dos fármacos não possui grande semelhança com os componentes naturais de uma célula, esses não serão transportados através de membranas por processos ativos, restando a difusão passiva, esta dependendo então da lipossolubilidade da molécula (Gringauz, A., 1997; Hansch, C. – Leo, A., 1995; Patrick, G. L., 2001; Silverman, R. B., 2004).

A teoria dos compartimentos é o modelo mais adotado em farmacocinética e prevê a distribuição de um fármaco em diferentes tecidos após sua absorção pela via de administração. A figura 3 ilustra, de modo simplificado, a absorção e distribuição de um fármaco no sistema biológico (Gringauz, A., 1997; Patrick, G. L., 2001; Silverman, R. B., 2004).

Figura 3: Modelo de compartimentos para absorção, distribuição e eliminação de fármacos.

Após sua administração, o fármaco atinge a circulação sanguínea, representada na figura 3 pelo compartimento A. Por cada compartimento que a molécula se distribui, a mesma pode ser armazenada ou inativada por reações metabólicas. Entre diferentes compartimentos, e inclusive dentro de cada um deles, o fármaco se distribui atravessando meios lipofílicos e hidrofílicos; portanto, sua solubilidade em meio polar ou apolar é crucial quanto a concentração que atinge seus receptores, representados por 'R' na figura 3, interferindo então na ação farmacológica (Gringauz, A., 1997; Rang, H.P., et al.; 2001; Patrick, G. L., 2001).

A constante π hidrofobicidade, também designada por constante de Hansch (Hansch, C., 1964; Kubinyi, H., 1976, 1993; Hansch, C. – Leo, A., 1995; Tavares, L., 2004) representa a hidrofobicidade de grupos substituintes ou grupos de átomos e constitui como um dos mais utilizados para expressar a hidrofobicidade de parte de uma molécula.

O parâmetro π de Hansch é uma constante que se caracteriza pela medida da hidrofobicidade de um átomo ou grupo de átomo substituinte em uma molécula. Esta constante é determinada pela equação 1, dada pelo logaritmo da razão entre o coeficiente de partição do composto substituído e o coeficiente de partição do composto não substituído.

$$\pi_x = \log (P_x / P_H) \quad \text{ou} \\ \pi_x = \log (P_x) - \log (P_H) \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

π_x é o parâmetro que reflete a contribuição hidrofóbica do grupo substituinte, X;

P_x é o coeficiente de partição do composto X-substituído;

P_H é o coeficiente de partição do composto não substituído.

(HANSCH, C., FUGITA, T. JACS, v. 86, p. 1616-1626, 1964)

A solvatação pode ser descrita como a alteração de energia livre envolvida no movimento de uma molécula entre um meio aquoso para um semi-aquoso ou apolar. A força que move a partição de uma substância entre estes dois meios é dada pelo aumento de entropia que ocorre na liberação de moléculas de água, que ao solvatarem uma substância lipofílica, se encontram numa disposição ordenada, e ao serem deslocadas formam novas ligações de hidrogênio, deslocando para um sistema menos ordenado, entropicamente favorecido (Hansch, C., 1964 e 1972; Korolkovas, A., 1988; Barreiro, E. J., 2001; Silverman, R. B., 2004).

O parâmetro π de Hansch tem sido amplamente utilizado em modelos que correlacionam as propriedades físico-químicas com a bioatividade de um fármaco. A posição que um átomo ou grupo substituinte ocupam na molécula também influencia na hidrofobicidade e conseqüentemente no valor da constante π , sendo possível observar diferentes valores para um mesmo grupo substituinte em função de sua posição na molécula. (Kubinyi, H., 1976, 1993; Hansch, C., 1972, Hansch, C. – Leo, A., 1995; Barreiro, E., 2001).

Com o objetivo de se obter uma aproximação teórica da hidrofobicidade de uma molécula como um todo, sendo diretamente proporcional ao seu coeficiente de partição, Roelof Rekker propôs um modelo em que fragmentos da molécula contribuem com uma dada parcela hidrofóbica, cuja soma resulta no coeficiente de partição total da molécula (Rekker, R. F., 1977, 1979 e 1992). Primeiramente, a metodologia de Rekker não definiu o que seria um fragmento válido, e uma mesma molécula poderia ser desmembrada em fragmentos distintos resultando em valores diferentes do coeficiente de partição por fragmentos. Para iniciar o modelo, Rekker atribuiu primeiramente valores para os fragmentos polares, precedidos de fatores de correção conforme sua vizinhança, como por exemplo, se estão ligados a carbonos alifáticos ou aromáticos, por quantos carbonos estão distanciados, e outros fatores de proximidade, logo, o modelo se tornou mais complexo (Hansch, C. – Leo, A.,

1995). A equação 2 resume o modelo da aproximação para o cálculo do coeficiente por fragmentos:

$$\log P = \sum a_n f_n + \sum b_m F_m \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

$\log P$ é logaritmo do coeficiente de partição por fragmentos;

a é o número de ocorrências do fragmento ' f ' do tipo ' n ';

f_n é valor da contribuição hidrofóbica do fragmento do tipo ' n ';

b é o número de ocorrências da correção de fator ' F ' do tipo ' m ';

F_m é o valor da correção do tipo ' m ';

(Rekker, R. F.; Mannhold R. Calculation of Drug Lipophilicity. The Hydrophobic Fragmental Constant Approach, VCH Weinheim, 1992, p. 35)

Para padronizar os fatores de correção de proximidade, Rekker propôs que os mesmos poderiam ser atribuídos à primeira camada molecular de água de solvatação na superfície da molécula. Para tal, um número k , representando o número de moléculas de água dispostas na solvatação da superfície molecular local foi estipulado para cada tipo de correção de proximidade, por exemplo, a separação de um fragmento por um carbono estima-se $k=3$. Ao modelo, entretanto, foram extrapoladas novas complexidades quanto ao valor da contribuição hidrofóbica dos fragmentos e principalmente quanto a de sua vizinhança molecular. O modelo de Rekker, então, adicionou novos valores unindo fragmentos polares em fragmentos maiores a fim de reduzir erros. A partir do modelo de Rekker, algoritmos foram elaborados sistematizando o cálculo do coeficiente de partição por fragmentos, e foram ainda aperfeiçoados por dados de potencial de hidratação; entretanto, decisões do operador ainda eram essenciais para melhorar a aproximação e quantificar fatores de correção de proximidade, sendo que para um algoritmo ser completamente automatizado, o mesmo deve poder fragmentar estruturas de uma maneira única (Hansch, C. – Leo, A., 1995). Salienta-se que a constante fragmental embasou o desenvolvimento de programas computacionais que são, atualmente, amplamente utilizados para calcular o coeficiente de partição, ClogP, de pequenas moléculas.

Parâmetros cromatográficos, nos últimos anos, puderam determinar a hidrofobicidade relativa de muitos compostos, tendo a vantagem de serem experimentais. O tempo de retenção de um composto determinado em HPLC é

diretamente proporcional ao seu coeficiente de partição água / óleo (Seydel, J. K., 1985).

4.2.2.2. DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA E PARÂMETROS RELACIONADOS

Parâmetros eletrônicos descrevem o ambiente eletrônico de uma molécula. Estes parâmetros podem ser divididos entre os obtidos empiricamente e os não-empíricos. Os empíricos medem o efeito eletrônico de um substituinte sobre a variação de energia de uma reação química, no caso a interação fármaco-receptor. Os mais utilizados são a constante grupo, também conhecida como constante sigma, σ , de Hammett e constantes derivadas (σ_I , σ_R , σ^- , σ^+ , σ^* , σ'), constante de ionização, pKa, potencial de oxi-redução, distribuição de dipolos e constantes ρ e ρ' , de Swain & Lupton (Taft, R.W., 1957-1974; Swain, C. G., 1964; Korolkovas, A., 1988; Hansch, C. – Leo, A., 1995; Gringauz, A., 1997; Silverman, R.B., 2004; Tavares, L., 2004).

O efeito polar de grupos substituintes é constituído pela somatória entre o efeito indutivo e efeito de ressonância. O efeito indutivo deriva do deslocamento estático de cargas elétricas, esse provindo de diferenças de eletronegatividade entre átomos covalentemente ligados ou vizinhos; já o efeito de ressonância é definido pela deslocalização de elétrons através de insaturações conjugadas.

O parâmetro que descreve a somatória do efeito indutivo e de ressonância para um átomo ou grupo de átomos é a constante σ de Hammett. Hammett (1894-1987) correlacionou propriedades eletrônicas de ácidos e bases orgânicas com a constante de equilíbrio, K, observando que diferentes substituintes no anel de ácidos benzóicos alteram, de forma padronizada, a constante de equilíbrio, K, ou da velocidade de reação em meio aquoso (Assim, K., 2001). O efeito eletrônico de átomos ou grupo de átomos substituintes na constante de ionização é ilustrado na Figura 4.

Figura 4: Efeito eletrônico de substituintes sobre o deslocamento da constante de equilíbrio ácido/base.

Com base no conjunto de reações da figura 4, Hammett definiu uma equação para representar um modelo de influência eletrônica, originando a constante de grupo de Hammett, σ , que mede a influência eletrônica do grupo substituinte no sítio de reação da molécula. Esta medida é característica do grupo substituinte e independe do restante da molécula, sofrendo influência apenas da posição que ocupa. Esta é uma propriedade de caráter aditivo, ou seja, contribuições podem ser somadas salvo variações. Valores positivos de σ são observados em substituintes que, pela somatória de efeitos, atraem elétrons e valores negativos, em substituintes que repelem elétrons (Hansch, C., 1990; Gringauz, A., 1997; Assim, K., 2001; Tavares, L., 2004).

A equação 3 descreve a constante de Hammett:

$$\sigma = \log (K_x / K_0) \quad \text{ou}$$

$$\sigma = \log(K_x) - \log (K_0) \quad \text{ou ainda}$$

$$\log (K_x) = \rho \sigma + \log (K_0) \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:

K_x é a constante de equilíbrio do ácido benzóico (ou fenilacético) substituído;

K_0 é a constante de equilíbrio do ácido benzóico (ou fenilacético) não substituído;

σ é a constante de grupo;

ρ é a constante de reação.

(HAMMETT, L. P. Journal of American Chemical Society, v. 59, n.1, p. 96-103, 1937)

A equação de Hammett, no entanto, apresenta limitações, a primeira observada foi quanto ao substituinte na posição *orto*, pois este pode interferir

estéreo-quimicamente com o grupo funcional em questão, modificando o deslocamento eletrônico. Outra limitação deriva da definição da constante de Hammett ser baseada na constante de equilíbrio de ionização em meio aquoso ou, no mínimo, em um sistema de solventes polares, tal como água / etanol a 50%. Quando o mesmo modelo é empregado para solventes apolares ou menos polares, o valor de σ sofre desvios significativos, particularmente para substituintes com capacidade de formar ligações de hidrogênio ou com carga elétrica, como amina, hidroxila, trimetil-amônio ou carboxilato, particularmente quando se muda o solvente ou o sistema de solventes. Diversos trabalhos objetivaram então a definição de valores da constante de Hammett em diferentes solventes, porém o valor de referência é aquele provindo do modelo do ácido benzóico substituído em meio aquoso (Hansch, C. – Leo, A., 1995).

Uma outra limitação da constante de Hammett está relacionada com a polissubstituição do anel benzênico que nem sempre são aditivas. Intuitivamente, isto é justificado quando um substituinte interfere eletrônica ou estereo-quimicamente com outro substituinte (Hansch, C. – Leo, A., 1995). Substituintes que apresentam liberdade conformacional também podem ocasionar desvios na predição do valor da constante de Hammett quanto aos seus diferentes conformeros. Assim, o valor absoluto de σ pode ser desmembrado em seus componentes relativos aos seus efeitos indutivo e de ressonância (Assim, K., 2001; Hansch, C. – Leo, A., 1995; Tavares, L., 2004).

O efeito indutivo é considerado como o resultado da soma do efeito indutivo eletrostático, que se propaga do substituinte até o centro da reação através das ligações covalentes da molécula, chamado de efeito indutivo estático (I_s), enquanto o efeito de campo é dado pela propagação eletrostática através do solvente (D). Entretanto, tentativas empíricas e teóricas de se determinar o valor de cada um tiveram pouco sucesso; e assim ambos foram unidos como efeito indutivo de campo ou apenas como efeito indutivo (Hansch, C. – Leo, A., 1995).

Empiricamente, diferentes modelos foram propostos para se isolar o efeito indutivo de um substituinte e três deles se mostraram mais práticos. O primeiro modelo se baseia na constante de ionização de ácidos acético substituídos, onde se considera o efeito de ressonância como mínimo, porém se deve tomar cuidado quanto ao possível efeito estereo-químico. Os dois últimos modelos propuseram

uma estrutura orgânica cíclica, porém rígida, onde se isola o grupo substituinte, de modo a se propagar apenas o efeito indutivo. Nestas estruturas, os carbonos dos quais o grupo substituinte e o centro da reação são vizinhos, estão totalmente saturados por ligações carbono-carbono, impedindo conjugação de elétrons. Valores experimentais satisfatórios foram obtidos a partir destes dois últimos modelos, e os mesmos apresentaram boa correlação entre si (Taft, R. W., 1974; Hansch, C., 1990; Hansch, C. – Leo, A., 1995). Os modelos de tais estruturas são o ácido *para*-substituído-biciclo-[2,2,2]-octano-1-carboxílico e a *para*-substituído-quinuclidina, vistos na figura 5.

Figura 5: Estrutura do biciclo-[2,2,2]-octano-1-carboxílico *para*-substituído e quinuclidina *para*-substituída.

Um mesmo substituinte pode assumir valor positivo para o efeito indutivo, enquanto apresenta valor negativo para o efeito de ressonância, tal como é o caso do átomo de cloro, que através do modelo da dissociação do ácido cloro-acético, possui valor de efeito indutivo, $\sigma_I = +0,47$, e valor de efeito de ressonância, $\sigma_R = -0,25$, resultando em $+0,22$ para a constante de grupo de Hammett. Intuitivamente, pela sua eletronegatividade, o substituinte cloro desloca a nuvem eletrônica do grupo carboxílico favorecendo sua desprotonação, ao mesmo tempo que sua própria nuvem eletrônica, por ter orbitais ocupados mais altos, por ressonância pode repelir elétrons em direção ao centro da reação. De modo geral, o átomo de cloro favorece a dissociação do ácido carboxílico na ordem de 100 vezes, prevalecendo o efeito indutivo, pois o pKa do ácido cloro-acético é 2,81, enquanto o do ácido acético é 4,76 (Hansch, C. – Leo, A., 1995).

Seguindo o modelo da ionização de ácidos carboxílicos alifáticos, onde se considera predominante o efeito indutivo, Taft relatou que diversos trabalhos evidenciam que os dados obtidos do efeito indutivo, σ_I , na dissociação de compostos alifáticos são válidos para a contribuição indutiva de substituintes *meta* e *para* de

ácidos benzóicos (Taft, R. W., 1958). Os valores das contribuições se relacionam através da equação 4:

$$\sigma_p = \log (Kx^p / K_0) = \sigma_I + \sigma_R \quad (i)$$

$$\sigma_m = \log (Kx^m / K_0) = \sigma_I + \frac{1}{3} \sigma_R \quad (ii)$$

$$\sigma_I = 0,45 \sigma^* \quad (iii) \quad (\text{Equação 4})$$

Em que:

$Kx^{p \text{ ou } m}$ é a constante de equilíbrio do ácido benzóico *para*- e *meta*-substituído, respectivamente;

K_0 é a constante de equilíbrio do ácido benzóico não substituído;

σ_I é a contribuição do efeito indutivo;

σ_R é a contribuição do efeito de ressonância;

σ^* é a constante de Hammett tradicional para ácidos carboxílicos alifáticos;

(Taft, R. W. Journal of American Chemical Society, v. 80, p. 2436-2443, 1958)

De acordo com a equação 4, observa-se que o efeito de ressonância para substituintes na posição *meta* é equivalente a um terço do mesmo na posição *para*, pois esta pode apresentar estruturas de ressonância conjugadas até o centro da reação. Da mesma forma, observa-se que a contribuição do efeito indutivo em sistemas aromáticos equivale a 45% da interferência na constante de dissociação de ácidos carboxílicos alifáticos. Combinando (i) e (ii) da equação 4, pode-se excluir o termo σ_R , onde temos: $\sigma_m - \frac{1}{3} \sigma_p = \frac{2}{3} \sigma_I$, a primeira correlação entre as constantes de Hammett para substituintes na posição *para* e *meta*, isolando o efeito indutivo, que também apresentou boa correlação linear com a constante de Hammett para compostos alifáticos. Ressalta-se, no entanto, que as relações acima são válidas para substituintes desprovidos de carga elétrica (Taft, R. W., 1958). Em trabalho posterior, Taft ressaltou que a contribuição do efeito de ressonância em ácidos benzóicos substituídos pode cair para um décimo (ou seja, $\sigma_R^m \approx 0,10 \sigma_R^p$) quando tratamos entre as posições *para* e *meta*, onde há forte mudança de carga nas estruturas de conjugação (Taft, R. W., 1959).

Swain e Lupton, explorando a equação 3 e dado que os valores de σ_m e σ_p são formados por uma combinação de fatores, evitaram assumir que a contribuição indutiva é igual para o mesmo substituinte na posição *meta* e *para*. Logo, Swain e Lupton obtiveram as constantes ρ e ρ^* que são independentes do tipo de reação ou

ionização, solvente ou temperatura envolvidos no evento observado. Os dois autores demonstraram para uma série de 43 variações da constante de Hammett, σ'_s , envolvendo reações e composto dos mais variados, que todas são uma combinação linear de σ_m e σ_p ($a.\sigma_m + b.\sigma_p + c$) com coeficientes de correlação acima de 0,90. Assumindo que a ionização do ácido biciclo-[2,2,2]-octano-1-carboxílico *para*-substituído (figura 5) sofre interferência apenas do efeito indutivo, e que o substituinte trimetilamônia não apresenta efeito de ressonância, mesmo na posição *para*, Swain e Lupton puderam assumir, então, que os componentes do efeito indutivo e de ressonância exercidos pelo substituinte são dados por p.f. $\mathfrak{I}$ e por p.r. $\mathfrak{R}$, em que 'p' é uma constante da reação e 'f' e 'r' são pesos empíricos que independem do substituinte. Assim, a separação clara de ambos os efeitos foi definida (Swain, C. G., et al., 1968).

Outros parâmetros eletrônicos de origem não-empírica são relacionados com orbitais π da molécula, com suas energias correspondentes e com outros índices eletrônicos. Dentre eles citam-se os parâmetros energéticos que representam a capacidade de doar ou receber elétrons, resumida pela afinidade eletrônica, descrita por LUMO – *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, correspondente à energia da orbital vazio mais baixo, portanto mais propenso a receber elétron; potencial de ionização; HOMO – *Highest Occupied Molecular Orbital*, correspondente à energia da orbital ocupado mais alto, portanto mais propenso a doar elétron; energia de transferência de carga e energia de ressonância. Além destes, há os parâmetros eletrônicos estruturais, como carga eletrônica líquida, momentos dipolares, parciais ou totais da molécula entre outros (Korolkovas, A., 1988).

4.2.2.3. VOLUME MOLECULAR E PARÂMETROS RELACIONADOS

As propriedades de volume de uma molécula descrevem a disposição espacial de átomos ou grupos de átomos e suas interações (atração – repulsão). São quantificadas por parâmetros que representam a forma e o tamanho de substituintes introduzidos na molécula, que por sua vez origina efeitos estéreo-químicos moleculares.

O conhecimento teórico de dados sobre distâncias atômicas intra-moleculares, comprimento e ângulo de ligações, diâmetros atômicos, volumes

espaciais de grupos funcionais ou grupos de átomos, foi obtido principalmente por métodos de cristalografia de raio-X, em particular difração por raio-X; que também são largamente empregados para elucidar a natureza, estrutura e conformação de receptores biológicos, em geral de natureza protéica (Gringauz, A.; 1997).

A primeira grande dificuldade em parametrizar o volume de uma molécula advém de separá-la dos efeitos eletrônicos e de hidrofobicidade, uma vez que um grupo de átomos não interage apenas pela disposição de seu volume espacial, mas também pelos seus efeitos polares, hidrofóbicos, mobilização de nuvem eletrônica ou mesmo de elétrons (Hansch, C. – Leo, A., 1995).

Existem quatro tipos de parâmetros relacionados ao volume molecular que são representantes, respectivamente, do tamanho, da compactabilidade, da topologia e da dimensão de um grupo substituinte em uma direção definida. Taft trabalhou no isolamento do efeito estéreo-químico do efeito eletrônico de grupos substituintes em reações químicas. O parâmetro relacionado ao volume molecular foi proposto por Taft que partiu de observações relatadas por Ingold (Ingold, C. K., 1930), que assumiu que a razão entre as constantes de equilíbrio das reações de hidrólises de ésteres (ou esterificação) em meio básico e ácido, K_b/K_a , depende apenas da polaridade do grupo substituinte, uma vez mantidas as mesmas condições de reação, sistema de solventes e temperatura (Taft, R. W., 1952). Observou-se que este pressuposto é válido para hidrólise (ou esterificação) de ésteres alifáticos ou aromáticos *orto*-substituídos. Derivando o pressuposto de Ingold, Taft designou uma constante de grupo análoga ao sigma de Hammett, E_σ , que representa somente o efeito polar na reação química observada, mantidas as mesmas condições e tipo de reação. Considerando que o efeito de uma substituição na posição *orto* de um éster benzoato em sua constante de equilíbrio de hidrólise deriva apenas de efeitos polares e estéreo-químicos, e assumindo que ambos são independentes, ou seja integralmente aditivos, e que os efeitos de ressonância são negligenciáveis, pode-se então subtrair o efeito polar de um substituinte, E_σ , restando apenas o efeito estéreo-químico, E_s . Verificou-se, também, que o efeito do substituinte da hidrólise em meio ácido praticamente independe de fatores indutivos. Ressalta-se que o grupo metil representa o hidrogênio quanto ao composto não substituído quando se trabalhou com hidrólise de ésteres benzóicos, ou seja, comparou-se a constante de reação de hidrólise de *orto*-metil-benzoatos com

demais benzoatos-*orto*-substituídos (Taft, R. W., 1952). O primeiro modelo de Taft, definindo a constante de efeito estéreo-químico, é dado pela equação 5.

$$E_{\sigma} = \log (Kx / K_0)_B - \log (Kx / K_0)_A \quad (i)$$

$$E_s = \log (K / K_0) - E_{\sigma} \quad (ii) \quad (\text{equação 5})$$

Em que:

Kx é a constante de equilíbrio da reação de hidrólise do éster substituído;

K_0 é a constante de equilíbrio da reação de hidrólise do éster não substituído, ou *orto*-metil no caso de benzoatos;

K é a constante de equilíbrio da reação de hidrólise do éster substituído em qualquer meio;

A e B designam hidrólise em meio ácido ou básico;

E_{σ} é a constante de grupo que representa apenas efeito polar;

E_s é a constante de grupo estérica de Taft.

(Taft, R.W. Journal of the American Chemical Society, v. 74, p. 3120-3128, 1952)

O modelo de Taft, entretanto, assume considerações questionáveis; a primeira é a presunção de que a constante de equilíbrio de hidrólise do composto não substituído se mantém em meio ácido ou básico, a segunda considera totalmente independentes os efeitos polares e estéreo-químicos (MacPhee, J. A., et al., 1978). Teoricamente, a hidrólise ácida ou alcalina de ésteres alifáticos ou aromáticos tem forte influência estéreo-química de substituintes próximos ao centro da reação, pois a carbonila do éster, possuindo orbital sp^2 , dispõe seus substituintes afastados por 120° pela geometria do tetraedro e, durante o estado de transição, o mesmo carbono recebe mais um substituinte transitório, passado para orbital sp^3 , forçando os demais substituintes a se separarem por 109° , logo o impedimento estéreo-químico de um dos substituintes exerce grande influencia na energia necessária para atingir este estado transitório, a energia de ativação da reação (Taft, R. W., 1952; Hansch, C., 1990; Hansch, C. – Leo, A., 1995). A figura 6 ilustra a importância de efeitos estéreo-químicos na energia de ativação da hidrólise de ésteres, onde nota-se a maior relevância do volume de grupos substituintes quanto à estrutura de transição para a hidrólise ácido frente à básica.

Figura 6: efeito estéreo-químico de grupos na hidrólise ácida e básica de ésteres substituídos.

Postulados seguintes consideraram então que a hidrólise ácida de ésteres substituídos depende apenas de fatores estéreo-químicos do grupo substituinte, de modo que: $E_s = \log (K / K_0)_A$ (Taft, Robert W., 1960; MacPhee, J. A., et al., 1978). O parâmetro volume de Taft se correlaciona com o raio de van der Waals do grupo substituinte, e para substituintes constituídos de um único átomo, ou de um grupo de átomos simétricos, da forma AB_3 , o valor de E_s é diretamente proporcional ao raio de van der Waals, com alta correlação linear, sugerindo que este parâmetro é consideravelmente livre de fatores eletrônicos (MacPhee, J. A., et al., 1978). Estudos posteriores ao analisar o trabalho de Taft, no entanto, observaram que existe contribuição de ressonância do grupo substituinte, devendo então ser corrigido para E_s^c . Empiricamente, quanto mais volumosa for a cadeia alquílica do grupo substituinte, menos favorável será a reação de esterificação do ácido carboxílico com um álcool simples como o CH_3OH e o C_2H_5OH , nas determinações experimentais (MacPhee, J. A., et al., 1978).

Visto pela ilustração da figura 6, o parâmetro de Taft não está livre de fatores de ressonância, pois pode haver estruturas de conjugação envolvendo o orbital π da carbonila e a ligação desta com o α -carbono. Para substituintes pequenos, entretanto, o modelo original de Taft continua válido (Hancock, C. K., 1961; MacPhee, J. A., et al., 1978; Hansch, C. – Leo, A., 1995). Para substituintes simétricos foi possível aproximar uma escala das constantes de Taft, E_s , baseada nos raios de van der Waals, porém é pouco viável para substituintes assimétricos (Hansch, C. – Leo, A., 1995). A equação 6 estima uma constante estéreo-química, ν_x , baseada em raios moleculares de substituintes simétricos, ilustrados na figura 7 (Charton, M., 1971, 1975, 1976, 1978; Indoux, J. P., 1978).

$$\nu_x = r_{v \text{ min}} - r_v \text{ H} = r_{v \text{ min}} - 1,20 \quad (\text{equação 6})$$

Em que:

$r_{v \text{ min}}$ é o menor raio do substituinte;

$r_v \text{ H}$ é o raio do átomo de hidrogênio.

(Charton, M. JACS, 97(1552-1556), 1975.

Figura 7: Raios moleculares de substituintes simétricos AB_3 .

Inspirado no modelo da constante estéreo-química de grupo, a partir dos raios mínimos e máximos de Charton (Charton, M., 1971, 1975, 1976, 1978), foram desenvolvidos os parâmetros de esterimol de modo que qualquer grupo substituinte possa ter parâmetros estéreo-químicos calculados de uma forma sistemática. Verloop propôs a descrição dimensional de substituintes definindo direções de seus comprimentos e larguras moleculares. Partindo de cálculos baseados em dados de comprimentos e ângulos de ligações e parâmetros de liberdade de confôrmeros, esta dependendo de aproximações arbitrárias, porém lógicas, Verloop definiu requerimentos espaciais de grupos substituintes. Primeiramente, foram definidas cinco dimensões, das quais se descreve a extensão espacial de um grupo de átomos. A primeira dimensão, chamada de parâmetro de comprimento L , é definida pelo comprimento do grupo substituinte ao longo do eixo que liga seu primeiro átomo ao restante da molécula. As dimensões são ilustradas na figura 8 (Hansch, C., 1990).

Figura 8: Definição dos eixos e dimensões dos parâmetros de esterimol.

Uma vez direcionado o eixo da ligação e seu comprimento L , até a extremidade do substituinte, dois novos eixos são definidos do modo que os três sejam perpendiculares entre si, tais como as coordenadas espaciais definidas pelos eixos X, Y, Z . Ao longo dos dois eixos perpendiculares ao eixo da ligação, definem-se quatro novas dimensões, uma em cada sentido de direção. As quatro novas dimensões são então ordenadas conformes seus comprimentos e chamadas de B_1 , B_2 , B_3 , e B_4 , sendo B_1 a de menor comprimento e B_4 a de maior comprimento. Ao todo, as cinco dimensões dos parâmetros de esterimol definem uma caixa que circunda o volume espacial do grupo substituinte, ilustrada pela Figura 9 (Hansch, C. – Leo, A., 1995).

Figura 9: Definição da sexta dimensão dos parâmetros de esterimol.

Verloop e colaboradores verificaram que as cinco dimensões de esterimol poderiam ser abreviadas em apenas três sem perda de correlação, acrescentando a sexta, dada pela maior extensão do grupo substituinte no plano perpendicular ao eixo da ligação, vista na figura 9 (Hansch, C., 1990; Hansch, C. – Leo, A., 1995).

As três dimensões que resumem a distribuição espacial do grupo substituinte são então L , B_1 e B_5 . Especialmente para substituintes assimétricos, os comprimentos de esterimol podem ser definidos de maneiras diversas, levando a valores distintos, visto que um grupo de átomos sempre possui certa liberdade conformacional e sua dispersão espacial é dinâmica, consequentemente, e de modo geral, os parâmetros de esterimol não possuem alta correlação linear com os parâmetros estereo-químicos de Taft e seus derivados (Hansch, C., 1990; Hansch, C. – Leo, A., 1995). O nome esterimol deriva do programa *STERIMOL* que calculava aproximações das dimensões moleculares de substituintes (Hansch, C., 1990).

Observou-se que o volume de van der Waals de grupos substituintes apresenta alta correlação linear com a refratividade molar dos compostos abordados

nos estudos de parâmetros estereo-químicos (Charton, M., 1971; Hansch, C., 1990; Hansch, C. – Leo, A., 1995).

Os valores do ângulo η , visto na figura 10, de ácidos benzóicos *orto*-substituídos podem ser obtidos experimentalmente por difração de raio-X, sendo que os mesmos foram aproximados como função do raio de van der Waals do grupo substituinte.

Figura 10: Efeito estereo-químico na polarizabilidade de ácido benzóicos *orto*-substituídos.

A refratividade molar, representando a polarizabilidade de um composto também apresenta correlação linear com o parâmetro estereo-químico de Taft corrigido, E_s^c . Este, no entanto, não possui informação alguma sobre as dimensões, superfície ou sob qual ligação um substituinte mais complexo esta polarizado. Contudo, a polarizabilidade se mostra como um parâmetro de caráter estereo-químico válido, sendo correlacionada com volumes e pesos molares de grupos substituintes (Charton, M., 1971; Hansch, C., 1990; Hansch, C. – Leo, A., 1995).

4.3. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE BIOLÓGICA

As propriedades físico-químicas que descrevem a molécula de um fármaco regem a sua biodistribuição, a sua interação com respectivos receptores específicos e o processo de depuração. Consequentemente, ao se quantificar estas propriedades através de parâmetros físico-químicos, pode-se considerar que tais propriedades influenciam, de forma quali e quantitativa, na atividade biológica de fármacos (Patrick, L., 2001; Hansch, C., 1976, 1990).

Cada parâmetro físico-químico contribui, individualmente, para o estabelecimento da resposta biológica, podendo ser favorável ou desfavorável em diferentes magnitudes. A atividade biológica pode, então, ser expressa como uma

função matemática dependente das propriedades físico-químicas da molécula, representadas numericamente por meio de parâmetros adequados. A equação 7 representa, portanto, essa relação (Hansch, C., 1976, 1990; Hansch, C. – Leo, A., 1995; Wermuth, C., 2003).

$$AB = f(C)$$

ou

$$AB = f(H_{\text{hidrofóbico}} + E_{\text{eletrônico}} + E_{\text{estéreo-químico}}) \quad (\text{equação 7})$$

Em que:

AB = Atividade Biológica;

C = Parâmetros que descrevem a estrutura química;

H, E ou Es = Parâmetros representantes das propriedades que descrevem a molécula.

(Hansch, C. Journal of Medicinal Chemistry, v. 19, p. 01-06, 1976)

A atividade biológica pode ser expressa quantitativamente pela potência biológica, definida pelo logaritmo do inverso da concentração molar da molécula capaz de conferir a resposta biológica quantificada, $\log 1/C$, ou seja, quanto menor a concentração molar que exerce tal resposta, maior a potência biológica (Hansch, C., 1976, 1990; Hansch, C. – Leo, A., 1995; Wermuth, C., 2003). Este modelo pode ser empregado para quantificações de respostas biológicas, como por exemplo, inibição ou ativação enzimática, inibição do crescimento ou morte celular, efeitos anti-inflamatórios, anestésicos, hipnóticos, metabólicos, ou mesmo observações sintomatológicas (Hansch, C., 1976). Um modelo que parece tão simplificado, no entanto, deriva em enorme complexidade. A primeira dificuldade consiste em definir, com segurança, o próprio parâmetro que descreve as propriedades de uma estrutura química, como quantificá-lo, isolá-lo dos demais e determinar sua contribuição relativa na resposta biológica. Uma propriedade físico-química pode originar uma quantidade infinita de parâmetros representativos desta propriedade, necessitando de uma decisão de qual parâmetro escolher na tentativa de relacioná-lo, com segurança, com a atividade biológica (Hansch, C., 1976, 1990; Korolkovas, A., 1988; Gringauz, A., 1997; Williams, D., 2002; Silverman, R. B., 2004).

A Química Medicinal foi definida, primeiramente, como sendo o estudo da influência da estrutura química na atividade biológica, envolvendo a compreensão das contribuições relativas de cada grupo funcional da molécula nas propriedades físico-químicas e na atividade biológica de moléculas bioativas (Williams, D., 2002).

Neste sentido, a hidrofobicidade foi uma das primeiras propriedades a ser correlacionada com a atividade biológica. Os primeiros estudos datam do século XIX, e poucas décadas depois, muitos trabalhos a correlacionaram com eventos distintos, tais como toxicidade de álcoois de cadeia alquílica maior, depressão do sistema nervoso central por anestésicos gerais, efeitos narcóticos, atividade antimicrobiana e muitas outras (Korolkovas, A., 1988; Hansch, C., 1990; Wermuth, C., 2003).

Correlações lineares foram, inicialmente, estabelecidas para prever a atividade através da solubilidade, porém observou-se que esta propriedade favorecia a atividade biológica somente até certo limite, tendendo a uma relação inversa após este ponto (Hansch, C., 1990, Hansch, C. – Leo, A., 1995). Assim, considera-se que as propriedades moleculares atuam de forma integrada sobre a atividade biológica, sendo que muitos parâmetros estão correlacionados entre si. (Wermuth, C., 2003).

De modo a prever a influência simultânea de duas propriedades físico-químicas na atividade biológica de uma molécula, como por exemplo, a solubilidade e a distribuição eletrônica, dois parâmetros representativos desta propriedade podem ser analisados conjuntamente, como previsto na equação 7. Derivado desta equação, a análise simultânea de duas propriedades físico-químicas, chamada de análise de Hansch (Hansch, C., 1990; Hansch, C., - Leo, A., 1995, Patrick, L., 2001), utiliza as constantes de Hansch e Hammett de uma série de compostos análogos variados por um grupo substituinte. Cada átomo ou grupo de átomos substituintes na dada posição contribuem para aumentar ou diminuir a hidrofobicidade da molécula, ao mesmo tempo que contribuem para deslocar a nuvem eletrônica (atraindo ou repelindo) naquela região molecular.

Entretanto, se ao compararmos uma série de compostos análogos, cujos grupos substituintes apresentam variações de seus parâmetros físico-químicos representativos na mesma direção, por exemplo, todos aumentam a hidrofobicidade e a atração eletrônica na mesma magnitude, ao analisarmos a atividade biológica, não saberemos se esta está sendo favorecida ou desfavorecida por um fator ou outro. Portanto, a análise de Hansch deve ser precedida da visualização da dispersão dos parâmetros físico-químicos abordados, sendo que para análise multifatorial mais simples, abordando duas propriedades, o Diagrama de Craig escalona os valores dos parâmetros contributivos para cada substituinte. A Figura 11 ilustra

um exemplo do Diagrama de Craig apresentando a dispersão das constantes de Hansch e Hammett para alguns grupos substituintes (Hansch, C., 1990; Hansch, C., - Leo, A., 1995, Patrick, L., 2001).

Figura 11: Diagrama de Craig, dispersão das constantes de Hansch e de Hammett de grupos substituintes.

Como exemplificado na dispersão vista pelo Diagrama de Craig da Figura 11, é desejável que as contribuições dos grupos substituintes às propriedades físico-químicas estejam distribuídas em diferentes direções, ocupando os quatro quadrantes do Diagrama de Craig, logo, uma relação linear ou não linear, como o caso da hidrofobicidade, pode ser aproximada empregando duas propriedades simultaneamente (Hansch, C., 1990; Hansch, C., - Leo, A., 1995, Patrick, L., 2001).

4.4. NITRO-COMPOSTOS

Nitro-compostos têm sido objeto de estudo como agentes antimicrobianos, em particular os derivados nitro-heterocíclicos, desde a década de 1940, onde se observou elevada atividade antibacteriana em derivados 5-nitro-furânicos substituídos, como vistos na Figura 12, (Dodd, M.C. et al., 1944). Adicionalmente, a potência antibacteriana observada após incubação por 24 e 96 horas, de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus hemolyticus*, *Diplococcus pneumoniae*, *Echerichia coli* e *Pseudomonas pyocyanea* apresentaram significativa variação conforme o grupo substituinte na posição 2 do anel 5-nitro-heterocíclico. Potências menores foram observadas para derivados 5-nitro-furânicos que possuem grupo carbonila na posição 2 seguida de cadeia hidrocarbônica, em comparação àqueles sem carbonila. Também se observou aumento na atividade antimicrobiana nos derivados 5-nitro-furânicos que possuem o grupo azometínico, $-\text{CH}=\text{N}-\text{N}-\text{R}$, ligado na posição 2, em comparação a álcoois, ésteres e éteres (Dodd, M.C. et al., 1944).

Figura 12: Compostos 2-nitro-furânicos-5-substituídos (Dodd, M.C. et al., 1944).

Compostos 5-nitro-furânicos ou 5-nitro-tiofênicos 2-substituídos também apresentaram atividade frente a protozoários e helmintos (Gayral, M.C., et al., 1981). A estrutura comum dos derivados nitro-heterocíclicos com atividade antimicrobiana, (Gayral, M.C., et al., 1981), estão representados na figura 13.

Figura 13: Compostos 5-nitro-aromáticos-2-substituídos
(Gayral, M.C., et al., 1981).

Derivados 5-nitro-heterocíclicos frequentemente apresentaram atividade antiprotozoária, anti-helmíntica e antibacteriana *in-vitro*, particularmente frente a *Entamoeba histolytica* e *Trichomonas vaginalis*. Também provocaram redução da parasitemia *in vivo* de *Plasmodium berghei* e *Trypanosoma brucei* em camundongos, bem como apresentaram atividade frente a *Hymenolepis nana* e *Nippostrongylus brasiliensis* em camundongos. Observou-se que os derivados de 5-nitro-tiofênicos apresentam maior atividade em comparação aos derivados 5-nitro-furânicos, sendo que os homólogos não nitrados não apresentam atividade antiparasitária alguma. Quanto ao grupo substituinte na posição 2, observa-se leve tendência de aumento de atividade para aqueles que possuem anel aromático ao fim da ponte carbônica, e para os ensaios *in vivo* todos apresentaram alta toxicidade, em especial em doses acima de 200 mg/Kg/dia, considerando tratamentos de 4 a 7 dias (Gayral, M.C., et al., 1981).

Além dos protozoários acima citados, os composto 5-nitro-tiofênicos que possuem um grupo oxima na posição 2 apresentaram atividade inibitória frente a *Leishmania tropica* e *infantum* e frente a *Plasmodium falciparum*, vistos na Figura 14. Salienta-se que os análogos sem o grupo nitro perdem a atividade antiprotozoária. Observou-se também leve tendência de incremento na atividade antimicrobiana para composto de cadeia alquílicas maiores (Delmas, F., et al., 1993).

Figura 14: Compostos 2-nitro-tiofeno 5-substituídos
(Delmas, F., et al., 1993).

4.4.1 NITRO-COMPOSTOS EMPREGADOS NA TERAPÊUTICA ANTIMICROBIANA

Alguns compostos nitro-heterocíclicos são utilizados na terapêutica, entre eles, citam-se o metronidazol e a nitrofurantoína que são empregados como agentes antimicrobianos. A nitrofurantoína, um derivado nitro-furânico sintético é utilizado na prevenção e tratamento de infecções do trato urinário (Goodman, A.G., et al., 2000). Sua estrutura química está representada na figura 15.

Figura 15: Estrutura química da nitrofurantoína.

O mecanismo de ação desta classe de compostos envolve enzimas que reduzem o grupo nitro formando intermediários altamente reativos, responsáveis por danos ao material genético (Spielberg, S.P., 1981). Bactérias reduzem compostos nitro-furânicos mais rápido e em maior extensão que células de mamíferos. Como a redução dos compostos nitro-furânicos resulta em sua citotoxicidade, seja para células eucarioto como procarioto, compostos nitro-heterocíclicos são mais danosos aos microrganismos, ademais, células mais evoluídas possuem mecanismos bioquímicos mais desenvolvidos para desativar a ação de moléculas altamente reativas, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio providas da redução de nitro-compostos, resultando, portanto, na seletividade deste fármaco pela ação antimicrobiana. Cepas bacterianas susceptíveis à ação de fármacos nitro-furânicos raramente adquirem resistência durante o tratamento, entretanto, há microrganismos resistentes, como por exemplo, cepas das espécies *Proteus sp.*, *Pseudomonas sp.*,

Enterobacter sp. e *Klebsiella sp.* Para a maioria das espécies bacterianas susceptíveis, a nitrofurantoína tem ação bacteriostática em concentrações abaixo de 32 µg/mL (Rang, H.P., et al., 2001; Goodman, A.G., et al., 2000). Este fármaco, no entanto, apresenta diversos efeitos colaterais nas concentrações terapêuticas e, consequentemente, possui limitações na sua aplicação. Primeiramente, seu uso é limitado na ação antimicrobiana sistêmica, pois não atinge a concentração necessária no plasma devido a sua rápida eliminação. A meia vida plasmática é de apenas 0,3 a 1 hora, sendo 40% eliminado sob a forma inalterada na urina, atingindo concentrações de 200 µg/mL, justificando, portanto, sua aplicação preferencial no combate a infecções urinárias. Os efeitos adversos, sendo alguns deles muito indesejáveis, incluem toxicidade hepática, sendo observados casos graves de hepatite crônica (Black, M., et al., 1980), pulmonar (hipersensibilidade e fibrose pulmonar), leucopenia, anemia hemolítica e outras, disfunções neurológicas e neuropatias, incluindo desmielinização e degradação de nervos motores e sensitivos, causando até atrofia muscular. Certos efeitos adversos têm sido atribuídos a metabólitos tóxicos altamente reativos (Rang, H.P., et al., 2001; Goodman, A.G., et al., 2000).

O metronidazol é outro exemplo de nitro-composto empregado na terapêutica antimicrobiana, ativo contra agentes protozoários, enquanto a nifuroxazida é exemplo de composto derivado nitro-furânico, e tem sido empregado como antibacteriano de uso tópico (Goodman, A. G., et al., 2000). Suas estruturas estão representadas na figura 16.

(1)

(2)

Figura 16: Estruturas químicas do metronidazol (1) e da nifuroxazida (2).

O metronidazol é um derivado 5-nitro-imidazólico empregado na terapêutica como agente antimicrobiano há mais de 30 anos. Possui largo espectro de ação,

sendo empregado no tratamento de protozooses como amebíase, giardíase e tricomoniase. Quanto ao tratamento de infecções bacterianas, é empregado no combate a *Clostridium difficile*, gangrenas, infecções pós-operatórias e até úlcera associada à infecção por *Helicobacter pylori* (Williams, D., 2002). O grupo dos fármacos derivados de nitro-imidazóis apresenta propriedades notáveis, pois possui amplo espectro de ação, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, protozoários, helmintos e até frente a algumas células neoplásicas (Edwards, D., 1993).

A nifuroxazida, um composto 5-nitro-furânico, foi objeto de estudos onde sua estrutura química originou novos agentes antimicrobianos de estruturas análogas. Foram sintetizadas análogos à nifuroxazida e ensaiados frente a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi*, cujas estruturas variaram quanto ao grupo substituinte situado na posição *para*-fenílica (vide estrutura 2 da Figura 15). Também foram sintetizados compostos onde o anel furânico foi substituído pelo anel tiofênico (Rezende, P., 2002; Masunari, A., 2005; Reisdorfer, F., 2007). Os compostos estudados apresentaram diferenças quanto a potência antimicrobiana ao substituir o grupo hidroxila da molécula da nifuroxazida, bem como seu anel furânico. Pelas diferentes atividades antimicrobianas determinadas, representadas pela concentração inibitória mínima, observou-se que grupos substituintes eletrofílicos de pequeno volume na posição *para*-fenílica favorecem a atividade antimicrobiana, tanto para cepas bacterianas como parasitárias (Rezende, P., 2002; Masunari, A., 2005; Reisdorfer, F., 2007). A atividade antibacteriana também foi favorecida pela substituição do anel furânico por tiofênico (Rezende, P., 2002; Masunari, A., 2005). A hidrofobicidade também se mostrou como uma propriedade físico-química que influencia a atividade antimicrobiana de compostos análogos à nifuroxazida, sendo obtidas correlações com a constante de Hansch, bem como certa influência de efeitos estereo-químicos (Masunari, A., 2005). Ademais, cepas de *Staphylococcus aureus* com caráter de multi-resistência, cepa 3SP/R33 (CEB - Clone Endêmico Brasileiro), se mostraram susceptíveis aos compostos análogos à nifuroxazida (Masunari, A., 2005).

Outros derivados nitro-heterocíclicos que merecem destaque na terapêutica são o nifurtimox e o megalzol, um composto 5-nitro-furânico e um 5-nitro-imidazólico, respectivamente, cujas estruturas estão ilustradas na figura 17.

Figura 17: Estruturas químicas do nifurtimox (1) e megazol (2).

O nifurtimox é o agente de escolha para o combate do *Trypanosoma cruzi* na fase aguda da doença, atingindo percentual de até 80% de cura, mas é ineficiente para a fase crônica da doença. O megazol apesar de ter atividade frente ao *Trypanosoma cruzi*, não é utilizado na terapêutica antichagásica (Viodé, C., 1999; Williams, D., 2002).

4.4.2. MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE NITRO-COMPOSTOS

Estudos com derivados nitro-heterocíclicos demonstraram atividade antimicrobiana e antiparasitária, bem como aplicação terapêutica, onde os primeiros estudos comprovaram que compostos sem o grupo nitro não apresentavam ação antimicrobiana. Neste sentido, ainda na década de 1940, reconheceu-se que a ação antimicrobiana de derivados nitrofuranos está relacionada com a redução metabólica do grupo nitro (Müller, M., 1986; Declerck, P., 1986; Edwards, D., 1986, 1993; Viodé, C., 1999).

O metronidazol, cuja aplicação terapêutica teve amplo sucesso a partir de 1959, foi um dos compostos mais utilizados como modelo para determinação do mecanismo de ação antimicrobiana desta classe de compostos, possuindo ação frente a microrganismos anaeróbios e aeróbios (Müller, M., 1986; Declerck, P., 1986; Edwards, D., 1986, 1993; Viodé, C., 1999). O processo de ação antimicrobiana é dividido em quatro fases, sendo a primeira a difusão do composto pela célula alvo, seguida da ativação redutiva; terceiro a interação com espécies reativas de nitrogênio ou oxigênio com componentes intracelulares, e por final, a inativação das espécies reativas e quebra dos componentes intracelulares causando o efeito citotóxico.

A ativação redutiva é uma etapa crucial, sendo que mecanismos metabólicos atuam diretamente nesta ativação, influenciando a especificidade e a seletividade de ação de compostos nitro-heterocíclicos (Müller, M., 1986). Evidências demonstraram

que o primeiro nitro-radical formado resulta da redução por um elétron proveniente de componentes intracelulares, de modo que: $R-NO_2 + e \rightarrow R-NO_2^{\cdot-}$, o que, pela desmutação do nitro-ânion radical, origina espécies reativas de oxigênio: $R-NO_2^{\cdot-} + O_2 \rightarrow R-NO_2 + O_2^{\cdot-}$.

Diversos estudos correlacionaram o potencial de redução de nitro-compostos com atividade citotóxica e mutagênica em células procariotas e eucariotas, concluindo que para microrganismos anaeróbios facultativos e aeróbios, a atividade antimicrobiana aumenta com a facilidade de redução do composto, ou seja, a diminuição do potencial de redução. Os ciclos de oxi-redução naturais do metabolismo de células participam da redução do grupo nitro, primeiramente, doando um único elétron, o que envolve diversas enzimas, muitas das quais essenciais para a depuração de radicais livres (Kappus, H., 1986; Müller, M., 1986). A figura 18 propõe modelo simplificado para a ativação de nitro-compostos.

Figura 18: Ciclo de oxi-redução de nitro-compostos e ações deletérias em componentes intracelulares.

A redução do grupo nitro, dependendo do meio celular, continua além do ponto da formação do nitro-radical ânion, $NO_2^{\cdot-}$, e se desencadeia até o grupo hidroxilamina, e por final, amina, sendo esta inativa. Em presença de oxigênio, o radical nitro-ânion pode voltar ao grupo nitro, formando o radical superóxido, levando ao ciclo representado na figura 17 (Kappus, H., 1986; Whitmore, G., 1986). Na ausência de oxigênio, o grupo é reduzido por mecanismos de oxi-redução,

aumentando a produção de espécies reativas, o que leva à toxicidade seletiva dos compostos nitro-aromáticos para microrganismos anaeróbios ou células com baixo metabolismo de oxigênio (Tocher, J., 1997).

A ativação redutiva depende assim, de rotas metabólicas onde componentes celulares doam elétrons para o grupo nitro, cuja completa redução até grupo amino necessita de seis elétrons (Edwards, D., 1993). Células procariotas e eucariotas, de diferentes espécies de bactérias, protozoários, helmintos e mamíferos, apresentam diferentes composições quanto às enzimas envolvidas nos mecanismos de oxirredução. Enzimas e co-enzimas capazes de doar ou receber elétrons estão envolvidas em distintas funções, tais como metabolismo de substratos energéticos, metabolismo de substâncias exógenas, geração de ATP com ou sem utilização de oxigênio, como a cadeia de transporte de elétrons ou a glicólise, e mesmo depuração de espécies altamente reativas e citotóxicas. Consequentemente, os nitro-compostos são reduzidos biologicamente conforme seletividade dos mecanismos envolvidos e seu potencial de redução, o que por sua vez, influenciam na ação antimicrobiana, anti-tumoral e nos efeitos colaterais (Müller, M., 1986; Edwards, D., 1986; Whitmore, G., 1986; Tocher, J., 1997; Viodé, C., 1999).

A figura 19 ilustra as rotas de metabolismo com e sem a presença de oxigênio de compostos nitro-heterocíclicos, das quais se formam diferentes espécies reativas tais como nitro radical ânion, nitro radical ânion protonado, radical aromático, superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, radical hidroxilamina e radical azoxi (Edwards, D., 1993).

Figura 19: Vias de metabolização aeróbia e anaeróbia de nitro-compostos e ações deletérias.

Danos iniciais ao DNA são causados, possivelmente, por intermediários reativos de vida curta, originados pela redução do grupo nitro envolvendo menos de quatro elétrons (Tocher, J., 1997). Assim, compostos nitro-heterocíclicos também foram utilizados na quimioterapia contra carcinomas por atuarem sensibilizando células neoplásicas radio-resistentes em condições de hipóxia, tornando-as sensíveis à radiação, com baixo efeito sensibilizante em células aeróbias normais (Adams, G., 1986; Whitmore, G., 1986). Após ativação redutiva, compostos nitro-aromáticos também interagem com ácidos nucleicos, possivelmente interagindo com resíduos de adenina, tiamina e guanina (Declerck, P., 1986; Tocher, J., 1997).

4.4.3. COMPOSTOS OXADIAZOLÍNICOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Estudos envolvendo compostos nitro-aromáticos contendo o anel 1,3,4-oxadiazolínico apresentaram atividade antimicrobiana frente a diversos microrganismos incluindo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. A presença do grupo nitro na posição 5 de anel aromático substituído na posição 2 é crucial para a atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana, expressa pela concentração inibitória mínima, foi comparada com aquela dada pelos antibióticos de referência, entre eles citam-se a ceftriaxona, cefalosporina de terceira geração, como antibacteriano, e miconazol como anti-fúngico (Rollas, S., 2002). Entre os compostos oxadiazolínicos sintetizados e ensaiados frente aos microrganismos citados, encontra-se também aquele possuindo um grupo nitro-furânico. A Figura 20 apresenta as estruturas e valores de concentração inibitória mínima dos compostos oxadiazolínicos estudados (Rollas, S., 2002).

2,3,5-trisubstituída-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolina				
Ar =
Concentração inibitória mínima (µg / mL)				
<i>S. aureus</i>	8	62,5	16	125
<i>E. coli</i>	250	500	250	125
<i>P. aeruginosa</i>	250	250	250	125
<i>C. albicans</i>	8	250	250	125

Figura 20: Estrutura química e atividade antimicrobiana de compostos 2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos (Rollas, S., 2002).

A formação do anel oxadiazolínico pode ser considerada com uma ciclização oxidativa. Diversas rotas sintéticas para a ciclização do anel 1,3,4-oxadiazolínico foram descritas a partir de diferentes reagentes (Zhenhua, S., 2005; Cesarini, S., 2006). A proposta do mecanismo de ciclização do anel 2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínico deriva do mecanismo proposto para formação do anel 1,3,4-oxadiazolínico não hidratado, aromático. O reagente oxidativo no caso do anel aromático (1,3,4-oxadiazolina) possui um grupo eletrofílico, o qual sofre ataque pelo par de elétrons livre do átomo de nitrogênio de orbital π . Adicionalmente, o reagente de caráter mais oxidante para formação do anel 1,3,4-oxadiazolínico desprende um grupo de saída mais favorável, no caso bis(trifluoracetoxi)-iodo-benzeno, o que retira o grupo substituinte do átomo de nitrogênio (Zhenhua, S., 2005).

Para a ciclização do anel 2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínico, portanto, propõe-se primeiramente o ataque do par de elétrons livres do átomo de nitrogênio mais nucleofílico (orbital π) à carbonila do anidrido acético, clivando-o em acetato e grupo acetil. O deslocamento de par de elétrons do orbital π para o nitrogênio acetilado forma então um carbocátion transitório, cuja carga é equilibrada por ligação com o íon acetato. O mesmo carbono, ainda polarizado pela sua vizinhança eletronegativa, sofre ataque do par de elétrons livres do átomo de oxigênio da carbonila hidrazídica, fechando o anel, que é então estabilizado pela saída do grupo oxi-acetil e pelo próton amínico, formando uma ligação π e ciclizando a molécula. A figura 21 ilustra o mecanismo proposto de ciclização para formação do anel 2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínico.

Figura 21: Mecanismo de reação proposto para ciclização do anel 2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínico.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. REAGENTES, SOLVENTES E SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

- Ácidos 4-benzóico substituídos – Aldrich Chemical Company, Inc.;
- Ácido clorídrico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Ácido sulfúrico PA – Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Álcool etílico PA – Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Álcool metílico PA – Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Ácido sulfúrico PA – Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Ácido clorídrico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Dimetilsulfóxido PA – Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Anidrido acético PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Triclorometano PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Acetato de etila PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Éter etílico (éter sulfúrico) - Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Dimetilsulfóxido-d₆ 99,5% - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- Triclorometano deuterado – Cambridge Isotope Laboratories, Inc.;
- Brometo de potássio grau espectroscópico – Aldrich Chemical Co. Inc.;
- 5-nitro-2-tiofenocarboxaldeído – Aldrich Chemical Company, Inc.;
- Pentóxido de fósforo PA – Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Óxido de Fósforo (V) PA – Vetec Química Fina Ltda;
- Sulfato de sódio PA – Labsynth Produtos Químicos para Laboratórios;
- Água destilada de produção interna.

5.2. EQUIPAMENTOS

- Aparelho digital de ponto de fusão Micro-Química modelo MQAPF-301;
- Espectrofotômetro de Infravermelho Shimadzu IR-470;
- Balança analítica digital OHAUS (precisão 0,0001 g);
- Balança analítica digital Marte (precisão 0,01 g);
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker modelo Advanced DPX 300 – 300 MHz;

- Elementar Analyser Perkin-Elmer CHN 2400;
- Rota-evaporador Fisatom modelo 802;
- Bomba de vácuo QUIMIS Aparelhos Científicos Ltda.;
- Manta magnética – Fisatom modelo 12M - 120 W;
- Chapa magnética – Fisatom modelo 752 A - 530 W;
- Vidraria para laboratório – diversos fornecedores;
- Destilador de água, Marte;
- Autoclave digital horizontal, 60 L, Stermax – Produtos Médicos Ltda.;
- Estufa para Secagem e Esterilização MA 033 – Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda.;
- Contador de colônia mecânico CP 602 – Phoenix Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda.;
- Placa microdiluição (microplaca fundo chato estéril individual, 8 x 12 poços 350 µL) – Axygen Scientific Inc.;
- Pipeta multicanal (8 canais) 20 – 300 µL Gilson.

5.3. MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA

- Microrganismo: *Staphylococcus aureus*, cepa ATCC 25923;
- TSB (Tryptic Soy Broth), Merck KGaA. Preparado conforme especificação do fornecedor;
- PCA (Plate Count Agar), Merck KGaA. Preparado conforme especificação do fornecedor;
- Solução fisiológica esterilizada (cloreto de sódio 0,9%).

5.4. SÍNTESE, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os compostos estudados no presente trabalho foram obtidos a partir de rota sintética de quatro etapas, apresentada na Figura 22.

Figura 22: Rota sintética para obtenção dos compostos 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos.

Etapa 1: O ácido 4-benzóico substituído (Aldrich Chemical Company, Inc.) é esterificado em metanol anidro em meio ácido por adição de ácido sulfúrico concentrado, reação de esterificação de Fisher, mantido sob refluxo por 5 – 6 horas, produzindo o respectivo benzoato de metila. Utiliza-se a proporção ácido benzóico : metanol de 1:40 – 1:60 (peso/peso), respectivamente. Decorrido o tempo de reação o metanol é rota-evaporado, sob pressão reduzida até o início da precipitação do produto, sendo esta completada por resfriamento, onde então, o

produto sólido é filtrado sob pressão reduzida e lavado com água destilada gelada (Brown, W., 1998).

Etapa 2: O benzoato de metila 4-substituído reage com solução aquosa de hidrazina (60 – 80%), reação de amonólise, mantido sob refluxo por 15 minutos. Decorrido o tempo de reação, a solução é resfriada em banho de gelo e em seguida em banho de acetona e gelo seco (-15 °C), precipitando o produto que é então filtrado sob pressão reduzida e lavado com água destilada gelada. Nesta reação há a substituição do grupo metoxila (éster) pela hidrazina (Solomons, G., 2000).

Etapa 3: A benzidrazida obtida é submetida à reação de condensação com 5-nitro-2-tiofenocarboxaldeído em meio ácido contendo água, ácido acético, metanol e ácido sulfúrico concentrado nas proporções de 8:8:20:7 (volume/volume), respectivamente, em aquecimento a 80 °C, por 15 minutos. Após preparo da solução do meio reacional se adiciona primeiramente o aldeído que se solubiliza com aquecimento entre 60 e 80 °C. Em seguida se adiciona, em porções, a benzidrazida *para*-substituída, iniciando precipitação do produto, 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida *para*-substituída. Por fim, água é adicionada para auxiliar a precipitação, sendo completada após resfriamento da solução a 4 °C, por 24 h. (Brown, W., 1998; Morrison R., Boyd, R., 1997).

Etapa 4: A 5-nitro-2-tiofilideno-benzidrazida *para*-substituída, é solubilizada em anidrido acético na proporção de 1:20 a 1:200 (massa/massa), conforme sua solubilidade em anidrido acético. A mistura é aquecida até 70 – 110 °C e volumes extras de anidrido acético são adicionados até completa dissolução. Em seguida, o sistema é mantido sob refluxo entre 2 a 6 horas, em ambiente protegido da umidade do ar.

Decorrido o tempo de reação, a mistura é vertida em água destilada gelada. A mistura reacional é então mantida sob refrigeração por 24 horas, precipitando produto na fase sólida que é, em seguida, filtrado sob pressão reduzida (Rollas, S., 2002).

5.5. ANÁLISES DE IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL E PUREZA

Faixa de Fusão:

A faixa de fusão foi determinada através da visualização do início da fundição de pequena alíquota do composto, onde procura-se visualizar um fragmento mais cristalino do sólido, previamente seco na presença de pentóxido de fósforo em dessecador sob pressão reduzida. A fundição é realizada entre par de lamínulas de vidro com auxílio de lente para amplificação do campo visual, em aparelho digital de ponto de fusão.

Análise Elementar, % C H N:

Os compostos obtidos foram submetidos à análise elementar de % CHN, na forma sólida, utilizando equipamento Elementar Analyser Perkin-Elmer CHN 2400.

Ressonância Magnética Nuclear – Hidrogênio¹ e Carbono¹³:

Os compostos sintetizados foram submetidos à análise RMN-¹H e RMN-C¹³ após dissolvidos em dimetil-sulfóxido deuterado (DMSO-d₆), tendo como sinal de referência zero a inversão do spin do hidrogênio ou carbono¹³ do tetrametilsilano, utilizando espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear da marca Bruker DPX 300, operando a 300 MHz.

Absorção na região do Infra-Vermelho

Os composto sintetizados foram analisados por absorção na região do Infra-Vermelho, na forma sólida, dispersos em pastilha de KBr.

5.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana é medida pela determinação da concentração inibitória mínima. O método de macro-diluição (NCCLS, M7-A6), previamente utilizado para ensaios microbiológicos de análogos à nifuroxazida (Rezende, P., 2002; Masunari, A., 2005), foi adaptado para um método de micro-diluição, cuja metodologia foi desenvolvida para atender particularidades deste estudo.

Assim, neste trabalho utilizou-se o seguinte procedimento para a determinação da concentração inibitória mínima por micro-diluição:

Alíquotas (3 – 8 mg), em triplicata, do composto a ser testado foram solubilizadas em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solução é então diluída na ordem de 5 vezes em DMSO. Esta última solução é diluída na ordem de 5 em solução de meio de cultura TSB (Tryptose Soy Broth); um meio de cultura rico em soja e caseína, propício ao crescimento de diversas bactérias. A solução para ensaio biológico contém o composto na concentração de 6 a 12 µg/mL em TSB a 20% DMSO.

Pipeta-se 1,0 mL da solução de partida para um reservatório de diluições seriadas, de onde são retirados 100 µL para preenchimento dos poços em duas microplacas de diluições (idênticas), totalizando 200 µL de solução a menos do reservatório. A cada 200 µL retirados, completa-se volume para 1,0 mL com TSB, logo, a concentração do composto antimicrobiano decresce para 80% da inicial. Diluições sucessivas em razão geométrica de ordem 0,8 são obtidas repetindo-se a etapa anterior, até preencher 10 poços da microplaca. Em seguida adiciona-se 100 µL de inóculo em cada poço, exceto no 11. Nos pocos 11 e 12, são realizados os controles negativo e positivo do ensaio, respectivamente. No controle negativo, há apenas meio de cultura e solução antimicrobiana, enquanto no controle positivo há apenas meio de cultura e inóculo.

Após incubação por 18 horas a 35 °C, adiciona-se solução de indicador de pH, púrpura de bromocresol, que abaixo de pH 5,2 apresenta coloração amarelo-cinza e acima de pH 6,8 apresenta coloração violeta.

No último poço que apresentar coloração violeta, cujo poço seguinte apresenta tons amarelados e cinzas, estima-se que não houve crescimento bacteriano. As microplacas são incubadas em câmara de temperatura controlada, mantida à 35 ± 2 °C. A leitura é feita após 18 e 24 horas. Os ensaios são realizados em triplicata para cada composto (NCCLS, M7-A6).

Os meios de cultura, TSB e PCA, são preparados conforme indicação dos fornecedores. Ambos são comprados na forma de pó e solubilizados em água destilada (50-90°C) na proporção indicada. Em seguida são esterilizados por calor úmido em ciclo da autoclave.

O procedimento do ensaio microbiológico utilizado está esquematizado na figura 23.

Figura 23: Procedimento de determinação da Concentração Inibitória Mínima.

5.7. PREPARAÇÃO DO INOCULO

O inóculo da cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* é cultivado em meio de cultura PCA inclinado, e mantido em tubos de ensaio vedados. A cada 14 dias, o microrganismo é repicado para um novo crescimento a fim de sempre manter a cepa viável (NCCLS, M7-A6).

Para sua utilização no ensaio microbiológico, a cepa é repicada 24 horas antes do procedimento em três tubos de ensaio em PCA inclinado. Verificado visualmente o crescimento bacteriano sobre o meio cultura sólido, são adicionados 5,0 mL de solução fisiológica esterilizada para cada tubo de ensaio. O tubo é agitado para desprender as células bacterianas e formar uma suspensão opaca.

Os três volumes de 5,0 mL de suspensão microbiológica são vertidos em frasco de vidro contendo pérolas de vidro e então os 15,0 mL são mantidos sob agitação magnética por 30 minutos, a fim de quebrar a formação de 'cachos' típica do gênero *Staphylococci* originando uma suspensão de células homogênea.

A suspensão de células bacterianas pode ser comparada com a escala padrão de McFarland, em geral 0,5, a fim de padronizar a densidade do inóculo. Nesta escala, a turbidez padrão é obtida pela adição de 0,5 mL de solução de sulfato de bário (BaSO_4) a 0,048 mol/L em 99,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 0,18 mol/L, cuja absorvância em 625 nm deve variar de 0,08 a 0,10 para solução padrão McFarland de 0,5 (NCCLS, M7-A6).

Desta suspensão transfere-se 1,0 mL para 99,0 mL de solução fisiológica esterilizada em frasco de vidro contendo pérolas de vidro, e mantém-se por 15 minutos sob agitação. Assim, dilui-se a suspensão bacteriana em 100 vezes. A mesma operação é repetida novamente obtendo uma nova suspensão bacteriana 10.000 vezes mais diluída que a original. Por último, transfere-se 1,0 mL da última diluição para 99,0 mL de meio de cultura TSB esterilizado em frasco de vidro e pérolas de vidro para agitação magnética por mais 15 minutos. Esta última suspensão de microrganismo é 10^6 vezes mais diluída que a original e é utilizada para o ensaio da determinação da atividade antimicrobiana dos compostos em estudo (NCCLS, M7-A6). O procedimento descrito pode ser visualizado na figura 23.

5.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA

Interpreta-se a concentração bactericida mínima como aquela onde as células bacterianas, após incubação do ensaio microbiológico por 18 h, se tornaram inviáveis pelas próximas 24 h a 35 ± 2 °C por semeadura em placa de meio de cultura sólido PCA, quanto ao aparecimento de unidades formadoras de colônia.

Durante a leitura da concentração inibitória mínima, semeia-se uma alíquota do meio de cultura dos tubos de ensaio em placa de *petri* contendo meio de cultura sólido PCA, previamente esterilizado. Utiliza-se microalça recém flambada e resfriada em solução fisiológica estéril. Cada placa de *petri* é dividida radialmente em no máximo 6 partes, onde cada área recebe uma semeadura. Os poços escolhidos estão ao redor da faixa da concentração inibitória mínima e podem ser desconsiderados aqueles onde há certeza que houve crescimento bacteriano. Também verifica-se amostras dos controles positivo e negativo. Em seguida as placas de *petri* são incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. Após este período, verifica-se visualmente onde houve crescimento bacteriano pela identificação de unidades formadoras de colônia. Para aquele poço onde não houve nenhuma colônia, considera-se que havia uma concentração bactericida do composto testado, e assim estima-se a concentração mínima para inviabilizar todas as células bacterianas nas condições ensaiadas (NCCLS, M7-A6; Rezende, P., 2002; Masunari, A., 2005).

5.9. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)

Para validação do ensaio microbiológico, obtém-se inóculo uniforme para cada ensaio. Considera-se como faixa aceitável para o ensaio suspensão bacteriana contendo $1,0 \cdot 10^3$ a $1,0 \cdot 10^4$ UFC/mL (NCCLS, M7-A6). O procedimento de determinação desta carga microbiana segue o seguinte padrão:

Ao fim do ensaio, retira-se 1,0 mL do inóculo e semeia-se em meio de cultura PCA ainda líquido. Para manter o meio de cultura PCA líquido, deve-se conservá-lo quente, entre 30 a 50 °C. Em seguida, são vertidos, em 1,0 mL de inóculo, cerca de 10 mL de PCA líquido a cerca de 30 °C, poucos graus Celsius antes de sua

solidificação. Isto é feito para evitar que o excesso de temperatura não inviabilize as bactérias do inoculo, e então homogeneíza-se a mistura. Outra alíquota de 1,0 mL é retirada do inoculo e diluída em 9,0 mL de solução fisiológica estéril em tubo de ensaio. Após agitação do tubo, retira-se outro 1,0 mL para repetir a operação mais 4 vezes. Tem-se, no fim das operações, 5 tubos de ensaio contendo inoculo em solução fisiológica nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Um mL (1,0) de cada diluição é semeada em PCA ainda líquido em placa de *petri*. Toda as 6 placas são incubadas por 24 horas à 35 °C e as colônias formadas são quantificadas com ajuda de um contador de colônias (NCCLS, M7-A6).

6. RESULTADOS

6.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS

Foram sintetizados compostos análogos a 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas, entretanto, dificuldades sintéticas decorrentes da metodologia de síntese foram enfrentadas, levando ao desenvolvimento empírico de variações na reação e na etapa posterior de purificação e extração do produto sintetizado. Logo, após decorrido o tempo de reação, as seguintes variações metodológicas foram realizadas:

No caso de se usar excesso de anidrido acético (proporção acima de 1:100):

1 – Decorrido o tempo de reação, o excesso de anidrido acético é rota-evaporado sob pressão reduzida até proporção de 1:10. A mistura reacional é então mantida sob refrigeração por 24 horas para precipitação de produto.

No caso de se usar excesso de anidrido acético e não houver precipitação do produto no restante deste reagente após rota-evaporação:

2 – Decorrido o tempo de reação, o excesso de anidrido acético é rota-evaporado sob pressão reduzida até proporção de 1:10 e então adiciona-se água gelada na proporção de 2:1 (água:anidrido acético / volume:volume). A mistura reacional é então mantida sob refrigeração por 24 horas para precipitação de produto.

Demais casos:

3 – Decorrido o tempo de reação, o excesso de anidrido acético é rota-evaporado até proporção de 1:10 e então adiciona-se água quente, 90 °C, na proporção de 2:1 (água:anidrido acético / volume:volume). A mistura reacional é então mantida sob refrigeração por 24 horas para precipitação de produto. O sólido obtido nos procedimentos acima é novamente solubilizado em pequeno volume de etanol quente. A solução alcoólica é resfriada e mantida por mais 24 horas sob refrigeração. Caso se forme o cristal do produto, este é filtrado sob pressão reduzida e lavado com pequenas porções de água gelada.

Caso a segunda precipitação do produto não ocorra, esta é forçada com a adição de água ou água gelada. A nova mistura hidro-alcoólica é mantida sob refrigeração por mais 24 horas. O sólido obtido é filtrado sob pressão reduzida e lavado com pequenas porções de água gelada.

O produto final é então seco em dessecador sob pressão reduzida, em presença de pentóxido de fósforo.

Os análogos, compostos 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos, apresentam faixas de fusão com valores entre 70 e 180 °C. Os rendimentos da última etapa de síntese dos compostos obtidos variam de 50 a 70 %. Tais rendimentos foram calculados a partir da quantidade recuperada do composto final na forma sólida e após o processo de secagem.

A tabela 1 apresenta os valores da faixa de fusão e rendimento da última etapa de síntese dos compostos obtidos.

Tabela 1

Faixa de fusão e rendimento da última etapa de síntese de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol

R	MM	Faixa de fusão ¹ (°C)	Rendimento (%)
H	317,33	103,2 – 103,8	72
CH ₃	331,35	127,0 – 127,8	48
C ₂ H ₅	345,38	108,2 – 109,4	62
C ₃ H ₇	359,41	73,2 – 74,0	65
OCH ₃	347,35	109,5 – 111,0	51
OC ₂ H ₅	361,38	108,5 – 109,5	56
OC ₃ H ₇	375,41	102,0 – 103,0	50
Cl	351,77	130,0 – 131,4	70
I	443,22	156,0 – 157,0	55
CF ₃	385,32	135,0 – 136,5	59
CH(CH ₃) ₂	359,41	181,0 – 184,2	49

1 - A determinação da faixa de fusão dos compostos obtidos foi feita em lamínulas de vidro, utilizando aparelho digital da marca Micro Química, modelo MQAPF-301.

MM : Massa Molecular (g/mol)

6.2. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL E PUREZA DOS COMPOSTOS

A identificação estrutural dos compostos 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos foi evidenciada por análises espectrométricas de absorção na região do Infra-Vermelho, Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio¹ e carbono¹³ e Análise Elementar de % CHN.

O critério do teor de pureza foi verificado pela faixa de fusão e Análise Elementar de % CHN.

Análise Elementar % CHN:

A tabela 2 apresenta-se os dados obtidos da porcentagem teórica e experimental de carbono, hidrogênio e nitrogênio presente nos compostos sintetizados.

Tabela 2
Análise Elementar de
2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas

R	% C			% H			% N		
	Amostra ¹	Teórica	Δ^3	Amostra ¹	Teórica	Δ^3	Amostra ¹	Teórica	Δ^3
H ²	53,06	52,99	0,07	3,59	3,49	0,10	13,24	13,24	0,00
CH ₃	54,18	54,37	0,18	4,15	3,95	0,14	12,47	12,68	0,15
	54,21			4,03			12,58		
C ₂ H ₅	55,58	55,64	0,09	4,54	4,38	0,10	11,98	12,17	0,11
	55,52			4,43			12,14		
C ₃ H ₇	57,13	56,81	0,37	5,11	4,77	0,36	11,72	11,69	0,05
	57,23			5,16			11,77		
OCH ₃ ²	51,75	51,87	0,12	3,69	3,77	0,08	11,87	12,10	0,23
OC ₂ H ₅	52,68	53,18	0,47	3,91	4,18	0,33	11,11	11,63	0,47
	52,73			3,79			11,20		
OC ₃ H ₇	54,50	54,39	0,04	4,56	4,56	0,10	11,14	11,19	0,02
	54,37			4,77			11,28		
Cl	47,98	47,80	0,13	2,69	2,87	0,19	12,08	11,95	0,06
	47,88			2,67			11,95		
I	37,91	37,94	0,04	2,54	2,27	0,12	9,27	9,48	0,16
	37,89			2,29			9,37		
CF ₃	46,90	46,76	0,18	2,92	2,62	0,28	11,02	10,91	0,15
	46,98			2,89			11,11		
CH(CH ₃) ₂	57,34	56,81	0,45	4,94	4,77	0,20	12,88	11,69	1,06
	57,19			5,01			12,63		

1: Análises realizadas em duplicata.

2: Excepcionalmente, para o composto não substituído, análise foi unicamente.

3: Módulo das diferenças entre média aritmética da amostra e valor teórico.

Ressonância Magnética Nuclear:

Ressonância Magnética Nuclear – Hidrogênio¹:

Os análogos estudados, compostos 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos, possuem em comum 10 (dez) prótons, sendo 6 (seis) aromáticos, 1 (um) na região dos aromáticos (hidrogênio ligado ao anel oxadiazolínico), e 3 (três) metílicos.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de próton evidenciam a formação do anel 1,3,4-oxadiazolínico pelo surgimento de sinal alto na forma de singleto, próximo a 2,29 ppm, representando os três hidrogênios do grupo acetílico ligado ao átomo de nitrogênio do anel 1,3,4-oxadiazolínico; e pelo singleto na região dos aromáticos, próximo a 7,56 ppm, representando o hidrogênio ligado ao anel 1,3,4-oxadiazolínico. Os valores de acoplamento desses prótons e respectivas constantes de acoplamento estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3

Sinal de RMN-¹H (ppm) em DMSO-d₆ de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas

Composto (R)	grupo acetil			oxadizol-H		Ar-H _{tiofeno}		Ar-H _{tiofeno}		Ar-H _{fenil}		Ar-H _{fenil}	
	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆		H ₁		H ₂		H ₇	H ₈	H ₉	H ₁₀
H	2,29 (s)			7,63 (s)		7,47 (d) J = 4,31		8,07 (d) J = 4,31		7,88-7,86 (dd) J=8,61 e 7,18		7,58 – 7,55 (m) ^a	
CF ₃	2,31 (s)			7,62 (s)		7,51 (d) J = 4,33		8,10 – 8,06 (m) ^b		8,10 – 8,06 (m) ^b		7,93 (d) J = 8,47	
CH ₃	2,29 (s)			7,56 (s)		7,46 (d) J = 4,33		8,08-8,07 (dd) J = 4,33		7,76 (d) J = 7,91		7,37 (d) J = 7,91	
C ₂ H ₅	2,30 (s)			7,56 (s)		7,46 (dd) J = 4,33		8,06 (dd) J = 4,14		7,79 (dd) J = 8,10		7,39 (dd) J = 8,10	
C ₃ H ₇	2,28 (s)			7,56 (s)		7,46 (d) J = 4,07		8,07 (d) J = 4,07		7,80-7,77 (dd) J = 8,14		7,42-7,36 (t) J = 8,14	
OCH ₃	2,29 (s)			7,56 (s)		7,47 (d) J = 4,17		8,09 (d) J = 4,33		7,83 (d) J = 8,85		7,12 (d) J = 8,66	
OC ₂ H ₅	2,27 (s)			7,54 (s)		7,45 (d) J = 4,33		8,07 (d) J = 4,33		7,79 (d) J = 8,66		7,08 (d) J = 8,66	
OC ₃ H ₇	2,27 (s)			7,54 (s)		7,45 (d) J = 4,33		8,07 (d) J = 4,33		7,78 (d) J = 9,04		7,10 (d) J = 9,04	
Cl	2,29 (s)			7,58 (s)		7,48 (d) J = 4,33		8,08 (d) J = 4,33		7,87 (d) J = 8,10		7,63 (d) J = 8,29	
I	2,29 (s)			7,57 (s)		7,48 (d) J = 4,33		8,07 (d) J = 4,14		7,94 (d) J = 8,66		7,63 (d) J = 8,66	
CH(CH ₃) ₂	2,28 (s)			7,56 (s)		7,47 – 7,42 (m)		8,07 (d) J = 4,33		7,80 (d) J = 8,29		7,47-7,42 (m) J = 8,66	

s: singlete d: duplete (média) dd: duplo duplete (faixa) t: tripleto (faixa) m: multiplete (faixa)

Constantes de acoplamento (J) calculadas em Hz.

a-) sinal multiplete inclui átomo de hidrogênio para-fenílico do composto não substituído.

b-) sinais se fundiram representando, ao todo, 3 átomos de hidrogênio.

Análise espectrométrica específica de RMN-¹H para cada composto:

- **H** (não substituído): átomos na posição *meta* e *para* (3H) formaram multiplete na faixa de 7,58 – 7,55 ppm.
- **CF₃** (trifluor-metil): os dois átomos de hidrogênio na posição *meta*-fenílica e o átomo de hidrogênio ligado ao anel tiofênico, próximo ao grupo nitro, tiveram seus sinais na mesma região. Tal fenômeno, supõe-se, se deve à proximidade dos átomos de hidrogênio fenílicos ao grupo substituinte trifluormetil.
- **CH₃** (metil): sinal dos 3 hidrogênios da metila: singleto: 2,39 ppm
- **C₂H₅** (etil): sinais da cadeia alquílica: CH₃-CH₂-anel fenílico:
CH₃:- tripleto: 1,24 – 1,17 ppm
-CH₂-fenil: tetrapleto: 2,72 – 2,65 ppm
- **C₃H₇** (propil): sinais da cadeia alquílica: CH₃-CH₂-CH₂-anel fenílico
CH₃:- tripleto: 0,92 – 0,87 ppm
-CH₂:- sexpleto: 1,66 – 1,55 ppm
-CH₂-fenil: tripleto: 2,65 – 2,60 ppm
- **OCH₃** (metoxi): sinal dos 3 hidrogênios da metoxila: singleto: 3,86 ppm
- **OC₂H₅** (etoxi): sinais da cadeia alcóxica: CH₃-CH₂-O-anel fenílico
CH₃:- tripleto: 1,37 – 1,33 ppm
-CH₂-O-fenil: tetrapleto: 4,15 – 4,08 ppm
- **OC₃H₇** (propoxi): sinais da cadeia alcóxica: CH₃-CH₂-CH₂-O-anel fenílico
CH₃:- tripleto: 1,10 – 0,96 ppm
-CH₂:- sexpleto: 1,81 – 1,69 ppm
-CH₂-O-fenil: tripleto: 4,03 – 3,99 ppm
- **OCH(CH₃)₂** (isopropil): sinais da cadeia alquílica: (CH₃)₂-CH-anel fenílico:

(CH₃)₂:- duplete: 1,23 – 1,21 ppm

(CH₃)₂-CH-fenil: septaplete (multiplete): 3,02 – 2,92 ppm

- **Cl e I** (cloro e iodo): os compostos contendo os substituintes cloro e iodo não possuem nenhum sinal de acoplamento de próton característico.

Ressonância Magnética Nuclear - Carbono¹³ :

Os análogos estudados, compostos 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos, possuem em comum 14 (quatorze) carbonos, sendo 6 (seis) aromáticos fenílicos, 4 (quatro) aromáticos tiofênicos, 1 (um) carbonílico, 1 (um) alquílico, 1 (um) na região de frequência dos aromáticos (carbono do anel oxadiazolínico com orbital π), e 1 (um) situado em campo intermediário (carbono do anel oxadiazolínico com orbital σ).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13 evidenciam a formação do anel oxadiazolínico, bem como seu substituinte acetil, pelo surgimento de sinal característico da carbonila, próximo a 168 ppm e alquílico e próximo a 21 ppm (carbono metílico), representando os carbonos do grupo acetil, e pelo sinal em região intermediária, próximo a 87 ppm, representando o carbono oxadiazolínico saturado. Os valores de acoplamento desses carbonos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4

Sinal de RMN-¹³C (ppm) em DMSO-d₆ de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas

Composto (R)	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀ / C ₁₁	C ₁₂ / C ₁₃	C ₁₄
H	20,96	167,34	86,76	146,63	123,24	127,10	151,60	154,43	132,22	126,62	129,14	129,52
CF ₃	21,55	168,12	87,91	146,80	126,66	127,87	152,30	153,81	132,40	128,02	130,06	131,96
CH ₃	21,08	167,29	86,65	146,79	126,66	127,07	151,62	154,63	142,52	129,72	129,59	120,48
C ₂ H ₅	21,49	167,76	87,14	149,08	121,21	127,26	152,12	155,12	147,30	129,04	127,55	147,30
C ₃ H ₇	20,99	167,23	86,59	146,96	120,71	127,05	151,57	154,58	129,53	129,10	127,00	126,64
OCH ₃	21,00	167,16	86,49	146,89	114,66	127,03	151,59	154,54	129,56	128,61	115,36	162,29
OC ₂ H ₅	21,51	167,64	86,97	147,40	115,54	127,53	152,08	155,06	130,07	129,11	127,79	162,08
OC ₃ H ₇	21,51	167,64	86,96	147,40	115,56	127,53	152,08	155,06	130,7	129,11	129,10	162,25
Cl	20,97	167,42	87,07	146,44	122,16	127,19	151,68	153,65	128,41	129,51	129,33	136,90
I	21,04	167,43	87,06	146,50	100,00	122,78	151,72	154,06	129,55	128,28	127,22	138,09
CH(CH ₃) ₂	21,49	167,74	87,12	152,11	121,36	127,31	153,58	155,11	130,93	130,02	127,62	147,29

Análise espectrométrica específica de RMN-¹³C para cada composto:

- **H** (não substituído): carbono C₁₄, fenílico não substituído, sinal em 129,14 ppm.
- **CF₃** (trifluor-metil): carbono C₁₄, fenílico com o substituinte trifluor-metil, sinal em 131,96 ppm.

Carbono do grupo substituinte halogenado, CF₃: sinal em 126,61 ppm.

- **CH₃** (metil): sinal do carbono da metila: 21,00 ppm

- **C₂H₅** (etil): sinais dos carbonos da cadeia alquílica: CH₃-CH₂-anel fenílico:

CH₃:- 15,58 ppm

-CH₂-fenil: 28,64 ppm

- **C₃H₇** (propil): sinais dos carbonos da cadeia alquílica: CH₃-CH₂-CH₂-anel fenílico

CH₃:- 13,46 ppm

-CH₂:- 23,67 ppm

-CH₂-fenil: 37,05 ppm

- **OCH₃** (metoxi): sinal do carbono da metoxila: 55,52 ppm

- **OC₂H₅** (etoxi): sinais dos carbonos da cadeia alcóxica: CH₃-CH₂-O-anel fenílico

CH₃:- 14,92 ppm

-CH₂-O-fenil: 64,04 ppm

- **OC₃H₇** (propoxi): sinais dos carbonos da cadeia alcóxica: CH₃-CH₂-CH₂-O-anel fenílico

CH₃:- 10,76 ppm

-CH₂:- 22,35 ppm

-CH₂-O-fenil: 69,81 ppm

- **OCH(CH₃)₂** (isopropil): sinais dos carbonos da cadeia alquílica: (CH₃)₂-CH-anel fenílico:

(CH₃)₂:- 24,02 ppm

(CH₃)₂-CH-fenil: 33,97 ppm

- **Cl** (cloro) carbono C₁₄, fenílico ligado ao substituinte cloro, sinal em 136,90 ppm.
- **I** (iodo): carbono C₁₄, fenílico ligado ao substituinte iodo, sinal em 138,09 ppm.

Absorção na Região do Infra-Vermelho:

Embora o espectro de absorção de ondas eletromagnéticas na região do Infra-Vermelho não possa determinar a estrutura molecular de um composto, este pode evidenciar a presença de ligações peculiares identificando grupos funcionais.

Os compostos obtidos, análogos de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas, apresentam combinação extensa de ligações covalentes entre diversos átomos, entre elas, ligações C-H (sp³ e sp²), C=C, C=O, C=N, N=O, C-O (sp³ e sp²), O-C=N, C=N-N, C-N (sp³ e sp²), C-S (sp²) e C-halogênios, derivando ainda os diferentes tipos de vibrações presentes nas ligações moleculares. Portanto, como esperado, os espectros de absorção na região do Infra-Vermelho dos compostos sintetizados são complexos e abundantes em bandas de absorção.

Contudo, ao analisar os espectros dos diferentes análogos, foi possível observar a presença de padrões muito semelhantes entre um espectro e outro, caracterizando bandas de absorção marcantes e de fácil identificação, entre elas pode-se destacar as principais, a saber: banda em 1660 cm⁻¹, representando a carbonila (pico de maior intensidade do espectro), mesclada com pico fino e de baixa intensidade, representando ligação C=N alifática; e duas bandas finas e paralelas em 1500 e 1345 cm⁻¹, representando respectivamente os estiramentos assimétrico e simétrico do grupo nitro, N=O.

A tabela 5 apresenta os valores de frequência de absorção das bandas de absorção na região do Infra-Vermelho de diferentes ligações covalentes dos compostos obtidos.

Tabela 5

Número de Onda, em cm^{-1} , do espectro de absorção na Região do Infra-Vermelho de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas

Composto (R)	estiramento C=O	estiramento N=O assim.	estiramento N=O sim.	estiramento C=C aromático	estiramento C=N sp^2 alifático	estiramento C-H sp^3 alifático	estiramento C-H sp^2 aromático	estiramento C=C arom. tiofeno	estiramento C-O / C-N
H	1656	1504	1339	1536	1637	3093	-	1447	1264 / 1193
CF_3	1661	1501	1331	1578	1634	3078	3100	1443	1268 / 1177
CH_3	1667	1500	1345	1536	1637	2922 / 3102	3116	1433	1265 / 1180
C_2H_5	1657	1513	1343	1540	1637	2872 a 2972	3088/3112	1437	1260 / 1190
C_3H_7	1669	1501	1345	1536	1634	2870 a 2963	3108	1433	1267 / 1180
OCH_3	1658	1508/1516	1349	1542	1633	2838 a 3002	3086/3102	1440	1257 / 1178
OC_2H_5	1664	1515	1345	1541	1635	2902 a 2982	3110	1438	1256 / 1189
OC_3H_7	1668	1502	1346	1537	1640	2862 a 2958	3100/3114	1434	1254 / 1179
Cl	1661	1511	1352	1597	1626	2999 / 3089	3104	1441	1229 / 1173
I	1666	1497	1345	1590	1636	3103	3116	1448	1264 / 1183
$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	1670	1502	1342	1535	1633	2873 a 2962	3096/3114	1435	1267 / 1183

assi. = estiramento assimétrico

sim. = estiramento simétrico

Análise espectrométrica específica de absorção na região do Infra-Vermelho para cada composto:

- **H** (não substituído): estiramentos carbono – hidrogênio sp^3 : banda fina para média em 3093 cm^{-1} .
- **CF₃** (trifluor-metil): estiramento carbono sp^3 – Flúor: 1121 e 1231 cm^{-1} . CF_n forma bandas múltiplas e de alta intensidade entre 1350 e 1100 cm^{-1} (Pavia, D., et al., 1996).
- **CH₃** (metil): estiramentos carbono – hidrogênio sp^3 : banda larga em 2922 e banda fina em 3102 cm^{-1} .
- **C₂H₅** (etil): estiramentos carbono – hidrogênio sp^3 : diversas bandas finas entre 2872 e 2972 cm^{-1} .
- **C₃H₇** (propil): estiramentos carbono – hidrogênio sp^3 : diversas bandas finas entre 2870 e 2963 cm^{-1} .
- **OCH₃** (metoxi): estiramentos carbono – hidrogênio sp^3 : diversas bandas finas entre 2838 e 3002 cm^{-1} .
- **OC₂H₅** (etoxi): estiramentos carbono – hidrogênio sp^3 : diversas bandas finas entre 2902 e 2982 cm^{-1} .
- **OC₃H₇** (propoxi): estiramentos carbono – hidrogênio sp^3 : diversas bandas finas entre 2862 e 2958 cm^{-1} .
- **OCH(CH₃)₂** (isopropil): estiramentos carbono – hidrogênio sp^3 : diversas bandas finas entre 2873 e 2962 cm^{-1} .
- **Cl** (cloro): estiramento carbono aromático – Cloro: 838 cm^{-1}
- **I** (iodo): estiramento carbono aromático – Iodo: 888 cm^{-1}

6.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios para determinação da concentração inibitória mínima, CIM, foram realizados em triplicata ou quadruplicata e as leituras de inibição/crescimento foram efetuadas após 18 e 24 horas de incubação à 35 ± 2 °C. Na 1ª coluna da tabela 4, apresenta-se a concentração onde não houve crescimento bacteriano, enquanto na 2ª coluna encontra-se a faixa entre as concentrações sob as quais não houve crescimento e onde houve crescimento bacteriano mínimo detectável pelo método.

Tabela 6
Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas de
2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-substituído-fenil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas

R	CIM 18 h ($\mu\text{g/mL}$)	CIM 18 h faixa ($\mu\text{g/mL}$)	CIM 24 h ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
H	>3,07	3,07 – 2,46	>3,84	>6,00
CF ₃	>3,28	3,28 – 2,62	>4,10	>5,12
CH ₃	>3,28	3,28 – 2,62	>4,10	>6,40
C ₂ H ₅	>3,36	3,36 – 2,69	>6,56	> 8,20
C ₃ H ₇	>4,61	4,61 – 3,28	>5,72	>7,20
OCH ₃	>2,79	2,79 – 2,23	>4,35	> 6,80
OC ₂ H ₅	>2,95	2,95 – 2,36	>5,76	> 7,20
OC ₃ H ₇	>4,10	4,10 – 3,28	>6,40	>8,00
Cl	>2,46	2,46 – 1,97	>4,80	> 4,80
I	>3,58	3,58 – 2,87	>5,60	>7,00
CH(CH ₃) ₂	>3,52	3,52 – 2,82	>6,88	>6,88

CIM: Concentração inibitória Mínima
CBM: concentração bactericida mínima

7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

7.1. SÍNTESE E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS

A obtenção dos compostos utilizados neste trabalho foi realizada em quatro etapas, sendo que a última etapa foi a que apresentou maiores dificuldades práticas. As três primeiras etapas, realizadas como descritas e baseadas em trabalhos anteriores (Rezende, P., 2002; Masunari, A., 2005; Reisdorfer, F. P., 2007) não apresentaram desvios se mostrando reprodutivas.

Os intermediários obtidos nas quatro etapas da rota sintética, foram identificados pela faixa de fusão, e esta comparada com as mesmas de estudos com análogos à nifuroxazida (Rezende, P., 2002; Masunari, A., 2005).

Os compostos finais 1,3,4-oxadiazolínicos, foram identificados por espectrometria de absorção na região do Infra-Vermelho, Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio, Ressonância Magnética Nuclear de carbono¹³, e o critério de pureza determinado pela faixa de fusão e Análise Elementar %CNH.

A identificação estrutural dos compostos 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos, foi realizada por sinais característicos destacados no item 6.2.

Na espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio, destacam-se o sinal alto, singleto, próximo a 2,29 ppm, representando os três hidrogênios do grupo acetil ligado ao átomo de nitrogênio do anel 1,3,4-oxadiazolínico e sinal baixo, singleto, na região dos aromáticos, próximo a 7,56 ppm, representando o hidrogênio ligado ao anel 1,3,4-oxadiazolínico.

Na espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de carbono¹³, destacam-se os sinais característicos da carbonila, próximo a 168 ppm e do carbono alquílico próximo a 21 ppm (carbono metílico), representando os carbonos do grupo acetil; e pelo sinal em região intermediária, próximo a 87 ppm, representando o carbono oxadiazolínico saturado.

Os espectros de absorção na região do Infra-Vermelho, isoladamente, não podem identificar as estruturas dos compostos sintetizados, porém evidenciam bandas características destacadas no item 6.2.

As análises específicas dos sinais individuais para cada composto 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínico também estão destacadas no item 6.2., para os três tipos de análises espectrométricas.

Apesar da identificação positiva dos compostos 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos, a síntese da última etapa apresentou diversas dificuldades práticas e operacionais.

A primeira dificuldade encontrada na última etapa da rota de síntese dos compostos foi referente ao volume de anidrido acético utilizado, pois este atua tanto como solvente quanto reagente para a ciclização do anel 1,3,4-oxadiazolínico. Inicialmente, verificaram-se diferenças de solubilidade dos compostos precursores, 5-nitro-2-tiofilideno-benzidrazidas *para*-substituídas. Todos, no entanto, necessitaram de aquecimento para solubilização do soluto, e em seguida, quando necessário, volumes extras do anidrido acético foram adicionados até completa dissolução.

A segunda variável foi relacionada como tempo de reação. Alguns compostos foram formados entre uma e duas horas, enquanto outros necessitaram mais de seis horas de refluxo, para completar o fechamento do anel 1,3,4-oxadiazolínico.

A temperatura também se mostrou como um fator crítico, pois em casos que o refluxo foi mantido em temperaturas acima de 120 °C, houve degradação do composto precursor ou até sua perda completa. Estas dificuldades na reação de ciclização resultaram em rendimentos variados entre 40 e 70%.

Outro ponto de dificuldade operacional na última etapa da síntese foi a precipitação ou extração do composto final do meio reacional. Assim, o primeiro procedimento para precipitação do produto final do meio reacional foi a adição de água destilada resfriada. Contudo, em alguns casos, a precipitação não ocorreu demandando a necessidade de aplicação de artifícios mais complexos para o isolamento do produto de reação.

Uma das primeiras medidas para solucionar a dificuldade de precipitação foi a tentativa de extração do produto com solventes orgânicos, tais como éter dietílico, clorofórmio ou tetrahidrofurano. Contudo, o produto apresentou partição mediana pelo solvente orgânico adicionado, permanecendo sua maior fração no sistema anidrido acético / ácido acético, o que levou à necessidade de múltiplas passagens de extração, aumentando o volume utilizado e diminuindo a porcentagem de

recuperação do produto obtido. Portanto, o método de extração por solvente orgânico não foi utilizado como padrão, se mostrando pouco vantajoso.

A segunda metodologia utilizada para provocar precipitação do produto do meio reacional, foi tornar o sistema, anidrido acético / ácido acético / água, miscível, ou seja, formado por apenas uma fase, de modo que quebrasse a partição do produto pela fase orgânica separada. Para tal, o meio reacional, após adição de água, foi colocado em aquecimento e agitação por 15 a 45 minutos. Entretanto, a temperatura necessária para hidrolisar a fração do anidrido acético, a ponto do sistema se tornar miscível, se mostrou relativamente alta, entre 100 e 140 °C, o que sugere ter ocasionado a hidrólise do produto sintetizado, evidenciado, após análise por espectro de ressonância magnética nuclear, pela presença de ácido benzóico *para*-substituído. Para alguns compostos, tal procedimento, apesar de pouco prático, levou à precipitação do produto final.

O terceiro procedimento ensaiado com objetivo de forçar a precipitação do produto do meio reacional foi a redução do volume de anidrido acético por rota-evaporação, sob pressão reduzida. Contudo, este solvente possui ponto de ebulição relativamente alto, 140 °C, necessitando de temperaturas acima de 100 °C, para que se consiga reduzir, por rota-evaporação, o volume inicial em percentagem acima de 50%. Este processo também gerou degradação do composto final, se mostrando pouco viável.

Quanto às dificuldades operacionais da última etapa da rota sintética, a temperatura se mostrou como fator crítico. O aquecimento inicial, imprescindível para solubilização do composto precursor em anidrido acético, necessitou de temperaturas muito elevadas, usualmente maiores que as temperaturas de refluxo, em particular para compostos mais lipofílicos e possuindo grupos substituintes volumosos. Em alguns casos, temperaturas acima de 160 ° foram necessárias para completa dissolução o que, possivelmente, ocasionou degradação dos compostos precursores ou do produto da reação. A temperatura foi o fator de maior relevância observado na etapa de ciclização, sendo que a temperatura necessária para ativação dos reagentes, muitas vezes, conflitou com a temperatura em que os compostos clivavam, gerando uma faixa de temperatura muito estreita onde a reação é viável. A degradação ou clivagem dos compostos precursores ou mesmo dos compostos finais, 1,3,4-oxadiazolínicos, foi verificada por análise de faixa de

fusão, e para alguns casos em que foi possível isolar o produto da clivagem, evidenciou-se a presença de ácido benzóico *para*-substituído, tanto por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio como de carbono¹³.

O composto 2-[nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-etil-fenil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolina somente teve sua síntese sucedida após diversas tentativas conforme as variáveis da reação.

As seguintes condições operacionais e resultados obtidos estão apresentados na tabela 7, demonstrando a estreita faixa de temperatura em que a reação é possível.

Tabela 7

Variações reacionais da etapa de ciclização para formação do composto 2-[nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-etil-fenil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolina em anidrido acético (proporção 1:100 (peso/volume), tempo de refluxo 1,5 - 2 h)

Temperatura de refluxo (°C)	Temperatura de solubilização (°C)	Degradação	Síntese
140	70	sim	não
120	70	sim	não
100	70	sim	não
80	70	pouco	pouco
50	70	não	sim

A tabela 7 apresenta a mesma síntese, a ciclização do 5-nitro-tiofeno-4-etil-benzidrazida em anidrido acético, sob diferentes condições reacionais.

Este caso representa o composto sintetizado que gerou maiores dificuldades para sua obtenção. O composto precursor apenas se solubilizou em anidrido acético sob temperaturas acima de 70 °C, ao mesmo tempo que apresentou produtos de degradação para refluxos mantidos acima de 80 °C. Portanto, a janela de temperatura que viabiliza a síntese é estreita, sendo necessário elevar temperatura até solubilização e baixar até temperatura mais baixa, 50 °C, fixando-a sob refluxo.

Entretanto, para outros análogos de 2-[nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas, a temperatura necessária para obtenção do composto ciclizado se mostrou na faixa de 90 a 120 °C.

7.2. ENSAIO MICROBIOLÓGICO

O procedimento adotado para determinação da concentração inibitória mínima, CIM, foi a micro-diluição que se mostrou robusto e reprodutível. A aplicação deste procedimento permitiu que mais de dois compostos sejam testados por teste, em multiplicata, reduzindo tempo de trabalho e consumo de reagentes. Na maioria dos ensaios as multiplicatas apresentaram resultados idênticos, e sempre confirmaram os controles positivo e negativo.

O solvente utilizado para solubilizar os compostos testados, dimetilsulfóxido, também foi testado a fim de verificar sua interferência no crescimento microbiano. As mesmas concentrações, conforme procedimento de diluições, foram testadas e incubadas em presença de inóculo com a mesma contração utilizada nos testes com os compostos analisados. Foram testadas concentrações de até 20% de DMSO em meio de cultura TSB, verificando que concentrações acima de 15% inibem o crescimento microbiano. Este, porém, se mostrou tolerante para concentrações de até 12% de DMSO.

Os ensaios foram realizados em duas micro-placas, ou seja, cada placa continha as diluições seriadas de cada composto para cada pesagem de amostra. A finalidade deste procedimento, além de propiciar mais segurança ao ensaio, foi feito para que em uma seja adicionado o indicador de pH, púrpura de bromocresol, enquanto a outra cópia era resguardada para o procedimento de determinação da concentração bactericida mínima e leitura de inibição de crescimento em 24 horas.

O indicador de pH propiciou fácil leitura visual, contudo, o ensaio de CIM em micro-diluição apresenta limite de precisão em 0,5 µg/mL, onde concentrações separadas por menos de 0,5 µg/mL podem apresentar resultados idênticos. Em geral o ensaio determina faixas de CIM da ordem de 1 µg/mL.

A figura 24 apresenta micro-placas do ensaio de CIM após término do procedimento, enquanto a figura 25 ilustra etapas do procedimento do ensaio microbiológico, logo após incubação por 18 horas.

Figura 24: foto das micro-placas do ensaio microbiológico.

Figura 25: procedimento de adição de solução de indicador de pH, púrpura de bromocresol, antes (1), e após visualização da mudança de coloração (2). Incubação por 18 h.

As micro-placas contêm 8 fileiras de poços de 350 μL , seqüenciadas de A a H, e em cada fileira os poços são numerados de 1 a 12. As diluições do composto testado decrescem do poço 1 até o 10, na ordem de 0,8, ou seja, cada poço possui concentração de 80% do anterior. As fileiras 10 e 12 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. A figura 26 ilustra um resultado de CIM com 18 horas de incubação e após adição de bromocresol como indicador de pH.

(1)

(2)

Figura 26: Concentração inibitória mínima. Teste com 18 horas de incubação e adição de púrpura de bromocresol como indicador de pH. Visualização lateral (1) e horizontal (2).

As fileiras A, B, C e D da figura 24 são diluições do composto testado em quadruplicata, enquanto as fileiras E, F, G são de outro composto testado em triplicata. A última fileira H é o controle do solvente DMSO, cuja concentração inicial é de 10%, decaindo na ordem de 0,8. A concentração inibitória mínima, CIM, é observada na última diluição em que a coloração se mantém púrpura, enquanto o próximo poço apresenta tons de amarelo pálido.

7.3. ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os valores das concentrações inibitórias mínimas em 18 horas, CIM, foram correlacionados com parâmetros que expressam propriedades físico-químicas dos grupos substituintes presentes nas moléculas análogas.

Os compostos foram ordenados, primeiramente, em ordem crescente dos valores de CIM, ou seja, em ordem decrescente da atividade antimicrobiana.

Os grupos substituintes podem influenciar a atividade antimicrobiana por diferentes mecanismos, que foram abordados separadamente com o objetivo de facilitar a determinação dos fatores estruturais que interferem na atividade biológica. A primeira propriedade físico-química analisada foi a parcela com que cada grupo substituinte analisado contribui para a solubilidade do composto como um todo, e esta foi representada pela constante de Hansch (π) ou pelo ClogP. Em seguida, considerando as alterações na distribuição eletrônica da molécula, resultantes da presença de grupos substituintes na posição *para*-fenílica, utilizou-se a constante de Hammett (σ), suas constantes derivadas, σ_I e σ_R , e as constantes ρ e ρ_R , de Swain & Lupton. Por final, a influência do volume do grupo substituinte foi abordada de forma simplificada sendo representada apenas pela dimensão L , dos parâmetros de esterimol. A tabela 8 apresenta os valores de concentração inibitória mínima, CIM, expressos em $\mu\text{g/mL}$, valores de potência antimicrobiana, $\log(1/C)$, C: mol/L; e os valores das constantes físico-químicas referentes aos grupos substituintes considerados neste trabalho.

Tabela 8
Concentrações Inibitórias Mínimas 18 h versus
Parâmetros hidrofóbicos, eletrônicos e estérico de
2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas

R	CIM 18 h	log (1/C)	π	ClogP	σ_p	σ_I	σ_R	$\mathcal{F}$	$\mathcal{R}$	L
Cl	2,46	-0,84	0,71	3,432	0,23	0,47	-0,25	0,42	-0,19	3,52
OCH ₃	2,79	-0,90	-0,02	2,638	-0,27	0,27	-0,43	0,29	-0,56	3,98
OC ₂ H ₅	2,95	-0,91	0,38	3,167	-0,24	0,28	-0,44	0,26	-0,50	4,92
H	3,07	-0,98	0,00	2,719	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,06
CF ₃	3,28	-0,93	0,88	3,602	0,54	0,40	0,11	0,38	0,16	3,30
CH ₃	3,28	-1,00	0,56	3,218	-0,17	-0,04	-0,14	0,01	-0,18	3,00
C ₂ H ₅	3,36	-0,99	1,02	3,747	-0,15	-0,01	-0,10	0,00	-0,15	4,11
CH(CH ₃) ₂	3,52	-0,99	1,53	4,146	-0,15	-0,01	-0,12	0,04	-0,19	4,11
I	3,58	-0,91	1,12	3,842	0,18	0,39	-0,16	0,42	-0,24	4,23
OC ₃ H ₇	4,10	-1,03	1,05	3,696	-0,25	0,28	-0,52	0,26	-0,51	6,05
C ₃ H ₇	4,61	-1,11	1,55	4,276	-0,13	-0,01	-0,11	0,01	-0,14	5,05

CIM: concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$); log (1/C): potência antimicrobiana ($1/\mu\text{M}$); σ_p , σ_I , σ_R :: constantes de Hammett; $\mathcal{F}$, $\mathcal{R}$:: constantes de Swain & Lupton; π : constante de Hansch; L: dimensão L de esterimol; ClogP: coeficiente de partição calculado (*ClogP Program versão 4.0*, Biocyte Co). Os valores das constantes físico-químicas foram extraídos de Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D. *Exploring QSAR. Hydrophobic, Eletronic, and Steric Constants*, American Chemical Society, 1995.

Os grupos substituintes foram ordenados conforme o Diagrama de Craig escalonando as contribuições hidrofóbica e eletrônica, apresentado na Figura 27.

Figura 27: Disposição das constantes de Hansch e Hammett dos grupos substituintes.

Como visto na Figura 27, os grupos substituintes não estão igualmente dispersos pelos quatro quadrantes do Diagrama de Craig, e sim, estão concentrados no 1º e 2º quadrante, o que impossibilita uma análise tradicional de Hansch, que correlacionaria quantitativamente a atividade antimicrobiana de acordo com os parâmetros contributivos dos grupos substituintes. Muitos análogos com substituintes presentes no 3º ou 4º quadrante tiveram sua síntese tentada, porém não sucedida, como é o caso dos grupos hidroxila, acetila, nitro, série das aminas, sulfamoiil e ciano.

Ao em vez de uma abordagem quantitativa, que poderia levar a uma equação quantificando os pesos de cada propriedade físico-química, a análise procede tentará abordar cada influência provinda dos substituintes isoladamente, para isto, pares ou séries de substituintes foram comparados, de modo que um parâmetro

descriptor varie enquanto os demais permaneçam constantes, a fim de analisar sua influência na atividade antimicrobiana.

7.3.1. INFLUÊNCIA DA HIDROFOBICIDADE

Uma vez que a atividade biológica sofre influência das propriedades físico-químicas de forma conjunta, a relação entre estas e os fatores estruturais é facilitada por comparações parceladas, ou seja, entre pares de compostos ou grupo de compostos possuindo alguma característica em comum.

Os dois mais importantes parâmetros representantes da solubilidade dos compostos, constante de Hansch e coeficiente de partição calculado, ClogP, para uma série de compostos análogos, são linearmente dependentes, ou seja, um pode ser expresso como uma combinação linear do outro, pois o cálculo parcelado do ClogP se utiliza de valores da contribuição hidrofóbica de cada grupo substituinte componente da molécula. Assim, O valor ClogP representa a solubilidade da molécula como um todo, enquanto a constante de Hansch representa a contribuição de um determinado grupo substituinte para solubilidade da molécula.

Logo, a relação entre a solubilidade dos compostos e sua atividade antimicrobiana pode ser analisada através de apenas um dos dois parâmetros, sendo neste trabalho a constante de Hansch a mais significativa, por representar a contribuição dos substituintes, que foi o foco da alteração no conjunto de compostos estudados. Assim, em função desta variação, verificou-se que a atividade antimicrobiana dos compostos 1,3,4-oxadiazolínicos sofre relevante influência da solubilidade, influenciada pela presença dos grupos substituintes em posição *para*-fenólica.

A primeira análise comparativa foi feita considerando a substituição do hidrogênio pelo grupo *para*-metila, visto que este exerce efeito indutivo, σ_I , quase nulo e baixo efeito de ressonância, σ_R .

Observou-se que o grupo metila contribui significativamente para a lipossolubilidade do composto análogo, ao mesmo tempo que desfavorece a atividade antimicrobiana.

A segunda análise comparativa foi feita considerando os compostos análogos cloro-, trifluormetila- e iodo-substituídos. Este conjunto de compostos possui em comum o fato de terem substituintes com efeito de atração eletrônica por indução, σ_I , representados por valores muito próximos. A saber: 0,47; 0,40 e 0,39, respectivamente.

Nesta sequência, observa-se incremento gradual de lipossolubilidade, vistos também pelos crescentes valores de ClogPs, ao mesmo tempo em que a atividade antimicrobiana decai gradualmente com o aumento da lipofilicidade.

Entretanto, analisando os volumes moleculares dos grupos substituintes cloro, trifluormetila e iodo, sendo proporcionais aos pesos moleculares de cada um, 35, 69 e 127, respectivamente, evidencia-se que o efeito da solubilidade pode não ser o único que desfavorece atividade antimicrobiana, sugerindo que outros efeitos, inclusive o volume, possam estar contribuindo negativamente para interação fármaco-receptor.

A última análise comparativa foi feita nas séries dos grupos substituintes alquílicos e alcoílicos. Na série alquílica, dada pelo grupo metila, etila e propila, cada substituinte contribui na mesma proporção para o aumento da hidrofobicidade, π : 0,56; 1,02; 1,55, respectivamente, enquanto que a atividade antimicrobiana decai em proporção semelhante, CIM: 3,28; 3,36 e 4,61. O mesmo efeito foi observado na série dos alcoílicos, grupo metoxi, etoxi e propoxi, valores de π : -0,02; 0,38 e 1,05, respectivamente, onde a atividade também decai proporcionalmente, CIM: 2,79; 2,95 e 4,10. As tendências de correlação entre a solubilidade de ambas as séries e a atividade antimicrobiana foram aproximadas e estão ilustradas pelos gráficos dispostos na figura 28.

Figura 28: Tendência de correlação entre constante de Hansch e atividade antimicrobiana dos compostos alquílico e alcóxicos substituídos.

Na comparação entre as duas séries de substituintes, tem-se que para cada par alquílico / alcóxico, CH₃/OCH₃, C₂H₅/OC₂H₅, C₃H₇/OC₃H₇, a diminuição da lipofilicidade do primeiro para o segundo decorre em aumento da atividade antimicrobiana, novamente evidenciando a influência da solubilidade na ação biológica analisada. Contudo, dentro desta série de compostos, mais substituintes seriam necessários para confirmar relação entre a solubilidade e a atividade antimicrobiana, como por exemplo, o grupo hidroxila (π : -0,67) ou nitro (π : -0,28), uma vez que ambos contribuem para a diminuição da lipossolubilidade da série de análogos, porém a síntese destes análogos, embora tenha sido planejada, não foi sucedida neste trabalho. Desta forma, o composto menos lipossolúvel da série estudada é o metoxi-substituído, entretanto sua contribuição hidrofóbica tem valor de π = -0,02, ou seja, pouco contribui para diminuição da lipossolubilidade frente ao composto não substituído.

Concluindo, a somatória das comparações vistas evidencia que o aumento da lipossolubilidade, nos limites da faixa de π analisada, entre 0,0 e 0,50, desfavorece a atividade antimicrobiana.

De acordo com o modelo de distribuição entre compartimentos, a hidrofobicidade contribui positivamente para a atividade biológica até um determinado limite, e negativamente em seguida. Logo, propõe-se a hipótese de que parte dos compostos mais lipossolúveis pode ficar retida em componentes mais lipofílicos, tal como a parede celular bacteriana, diminuindo a porcentagem de moléculas que alcançam o alvo biológico, comprometendo assim o desencadeamento da ação antimicrobiana.

7.3.2. INFLUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA

Os efeitos eletrônicos de um grupo substituinte alteram a distribuição da nuvem eletrônica ao redor da molécula ou parte dela, interferindo tanto no mecanismo de reação como na interação fármaco-receptor.

Estudos relacionados com a influência eletrônica de substituintes na posição *para*-fenílica de compostos análogos à nifuroxazida demonstraram que a atividade antimicrobiana é favorecida por substituintes eletrofílicos por indução e de pequeno volume (Masunari, A., 2005). Para o caso dos derivados 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos, e visto que há uma distância de três anéis entre o grupo nitro e o grupo substituinte, sugere-se que o efeito eletrônico não interfere diretamente na redução do grupo nitro, tanto por indução como por ressonância. A influência eletrônica na atividade antimicrobiana, todavia, pode decorrer de mudança de polaridade da molécula, que ao se aproximar da superfície do receptor, esta apresenta maior afinidade. Neste caso, o efeito eletrônico por indução teria maior relevância que o efeito de ressonância, cujas deslocalização de elétrons estão limitadas a regiões da própria molécula.

Em análise comparativa do par de compostos análogos diferenciados pelos substituintes cloro- e metoxi-, observa-se que o efeito indutivo favorece a atividade antimicrobiana, como se segue abaixo.

O mesmo efeito, no entanto, não é observado quando se considera a substituição pelo grupo trifluormetila, onde o efeito eletrofílico por indução não é acompanhado por aumento de atividade. No entanto este substituinte aumenta a lipossolubilidade da molécula e contribui com efeito espacial de volume.

Na comparação entre as séries de substituintes alquílicos e alcoxílicos, onde a primeira não possui efeito eletrônico por indução significativo (σ_I entre -0,04 e -0,01) enquanto a segunda sim (σ_I entre 0,27 e 0,28), e visto que para cada par de substituinte alquílico / alcoxílico há decréscimo da concentração inibitória mínima, do primeiro para o segundo, observando que o efeito de atração eletrônica favorece a atividade antimicrobiana. Contudo, dentro da série de análogos estudada, não se dispõe de análogo com substituinte portador de efeito indutivo de repulsão eletrônica, de modo a permitir a comprovação do favorecimento do efeito de atração eletrônica sobre atividade antimicrobiana dos compostos estudados. Assim, considera-se, com base nas análises comparativas, que existe tendência do favorecimento da atividade antimicrobiana por substituintes eletrofílicos por indução. Porém essa observação não pode ser conclusiva em razão da necessidade de observação do comportamento de análogos portadores de substituintes com forte efeito indutivo de repulsão, ou seja, com capacidade de doação de elétrons, sobre a atividade biológica considerada.

7.3.2. INFLUÊNCIA DO VOLUME MOLECULAR

Os efeitos estereo-químicos, como conceituado pelo parâmetro estereo-químico de Taft, e apesar deste ter maior relevância histórica do que prática, sua definição provém da interferência estereo-química direta do grupo substituinte, no caso na posição *orto*, no centro da reação, podendo interferir no efeito farmacológico. Diferentemente da definição do parâmetro estereo-químico de Taft, o centro da reação nos compostos 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos estão a três anéis de distância do grupo substituinte, o que exclui qualquer possibilidade de influência estereo-química deste no processo de redução do grupo nitro.

Os parâmetros estereo-químicos que representam a forma e dispersão espacial de um grupo substituinte são bastante diversos e oriundos de diferentes definições, e nenhum, como um todo, é capaz de descrever isoladamente e de forma segura o volume de parte de uma molécula.

A dimensão L , sendo o comprimento do eixo que liga o primeiro átomo do grupo substituinte ao restante da molécula, neste caso então, seria proporcional ao

volume espacial dos grupos substituintes. Tanto para a série dos substituintes alquílicos como alcóxílicos, sendo que o valor de L aumenta conforme o tamanho da cadeia carbônica.

Este efeito, no entanto, está sobreposto ao efeito da solubilidade como visto na análise da influência hidrofóbica. Assim, a mesma comparação é válida para os compostos cloro-, trifluormetila- e iodo-substituídos, cujo aumento gradual de volume espacial, que desfavorece atividade antimicrobiana, é sobreposto ao aumento de lipossolubilidade.

Considerando que, embora o grupo trifluormetila possua dimensão L de esterimol menor que o grupo cloro, este último é, sem dúvida, de menor volume que o primeiro, visto os pesos moleculares e constituição atômica de ambos, sugerindo, neste caso, que a direção do eixo L , por ser única, não abrange a extremidade dos átomos de flúor do grupo trifluormetila. Assim, dentro da série de análogos estudada, a única comparação em que se pode isolar efeito estereo-químico está no par formado pelos compostos propila e isopropila-substituídos. Estes grupos substituintes contribuem igualmente para a lipossolubilidade da molécula, bem como para o efeito eletrônico por indução e por ressonância. Contudo, os valores de L de ambos, assim como a atividade antimicrobiana diferem significativamente.

Apesar das contribuições hidrofóbica e eletrônica praticamente idêntica, o fato do grupo isopropila apresentar dispersão espacial mais compacta e globular, este

favoreceu a atividade antimicrobiana, cujo valor de CIM se aproxima daquele visto para o substituinte etila.

7.4. CONCLUSÕES

7.4.1. SÍNTESE

A maioria dos compostos da série planejada foi obtida e suas estruturas foram identificadas e comprovadas espectrometricamente. A pureza foi avaliada através de análise de CHN e através da faixa de fusão. A rota de síntese utilizada se mostrou reproduzível, porém pouco vantajosa em termos de rendimento de reação e praticidade.

O anidrido acético, utilizado como solvente, prejudicou tanto a porcentagem de recuperação do produto de reação como a viabilidade de sua extração, logo, se encoraja que outro sistema de reação, no qual anidrido acético participe apenas como reagente, seja experimentado, utilizando outro solvente orgânico como meio reacional, em princípio miscível em água.

7.4.2. ENSAIO MICROBIOLÓGICO

O procedimento de determinação da concentração inibitória mínima se mostrou prático e reproduzível, podendo ser empregado, com segurança.

A hidrofobicidade dos compostos se mostrou, através de diversas análises comparativas, como a propriedade físico-química mais influente na atividade biológica considerada. Sendo que, após determinado limite, o aumento desta propriedade desfavorece a atividade antimicrobiana, como esperado.

Não foi possível determinar, com precisão, a influência eletrônica na atividade biológica, apesar de se ter evidenciado tendência de favorecimento da atividade antimicrobiana por substituintes eletrofílicos por indução.

A análise de tendência de influência dos efeitos estereo-químicos ou de volume na atividade biológica não se mostraram conclusivas, mas é possível sugerir que o aumento do volume do grupo substituinte desfavorece a atividade antimicrobiana, cabendo estudos mais aprofundados para confirmação desta observação.

8. PERSPECTIVAS

Considera-se que estudos subsequentes devam ser feitos no sentido de permitir o esclarecimento de questões que não puderam ser explicadas neste trabalho, sugerindo o aumento da série de compostos visando a possibilidade de aplicação de estudos quantitativos como a Análise de Hansch e o estudo de QSAR e modelagem molecular, na expectativa de melhor conhecer as relações entre a estrutura química e a atividade biológica desta série de compostos.

Sugere-se também que novas rotas de síntese possam ser desenvolvidas utilizando outros agentes acetilantes, ou mesmo tri-fluor-acetilantes, como o bis-(trifluoroacetoxi)-iodo-benzeno, vistos na literatura (Zhenhua, S., 2005), em que a reação é realizada próxima à temperatura ambiente em DMSO anidro, sendo este uma possibilidade para o melhoramento das condições e rendimentos da ciclização do anel 1,3,4-oxadiazolínico.

Compostos 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolínicos apresentaram relevante ação antimicrobiana, sendo promissores objeto de estudo para expansão e aprofundamento dos conhecimentos acerca do seu espectro de atividade antimicrobiana, sugerindo a avaliação de seu perfil frente outros agentes etiológicos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, G. E.; Stratford, I. J. Hypoxia-mediated Nitro-heterocyclic Drugs in the Radio- and Chemotherapy of Cancer. *Biochemical Pharmacology*, v. 35, n. 1, p. 71-76, 1986.

Arrendondo, Y., Manãs, M., Pleixats, R., et al. Preparation, Antimicrobial Evaluation, and Mutagenicity of [2-hydroxyaryl]-[1-methyl-5-nitro-1*H*-2-imidazolyl]methanols, [5-tert-butyl-2-methylaminophenyl]-[1-methyl-5-nitro-1*H*-2-imidazolyl]methanol, and [2-hidroxyaryl]-[1-methyl-5-nitro-1*H*-2-imidazolyl]ketones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 5, n. 10, p. 1959-1968, 1997.

Asim, K. D. Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR). Paradigm – Hansch Era to New Millennium. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 1, p. 187-195, 2001.

Barreiro, E. J., Manssour, C. A. *Química Medicinal – As bases moleculares da ação dos fármacos*. Ed. Artmed, 2001.

Black, M., Rabin, L. Schatz, N. Nitrofurantoin-induced chronic active hepatitis. *Annu. Intern. Med.*, v. 92, p. 62-64, 1980.

Borman, S. New QSAR Techniques, Eyed for Environmental Assessments. *Chem. Eng. News*, v. 68, p. 20-23, 1990.

Brown, W. H., Foote, C. S. *Organic Chemistry*, Second Edition, Saunders College Publishing, 1998.

Cesarini, S., Colombo, N., Pulici, M., Felder, E. R., Brill, W. K.-D. 1,3,4-oxadiazole formation as traceless release in solid phase organic synthesis. *Tetrahedron Letters*, v. 62, p. 10223-10236, 2006.

Chambers, H. F., et al., Methicillin-resistant Staphylococci. *Clinical Microbiology Review*, v. 1, p. 173-186, 1988.

Charton, M. The Quantitative Treatment of the *Ortho* Effect, *Progress in Physical Organic Chemistry*, v. 8, p. 235-317, 1971.

Charton, M. Steric Effects I. Esterification and Acid-Catalyzed Hydrolysis of Esters, *Journal of the American Chemical Society*, v. 97, p. 1552-1556, 1975.

Charton, M. Steric Effects II. Based -Catalyzed Esters Hydrolysis, *Journal of the American Chemical Society*, v. 97, p. 3691-3693, 1975.

Charton, M. Steric Effects. 7. Additional ρ Constants, *Journal of Organic Chemistry*, v. 41, p. 2217-2220, 1976.

Charton, M. Steric Effects. 13. Composition of the Steric Parameter as a Function of Alkyl Branching, *Journal of Organic Chemistry*, v. 43, p. 3995-4001, 1978.

Clifford, L. M. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA. Associated Pathogens and Effect on Treatment Clinical Infectious Diseases. Trends in Antimicrobial Resistance in Health Care, v. 42, p. 65-71 (Suppl 2), 2006.

Dantas, G., Sommer, O. A., Oluwasegun, D. R. Bacteria Subsisting on Antibiotics. Science, v. 320, p. 100-103, 2008.

Declerck, P. J.; De Ranter, C. J. *In vitro* Reductive Activation of Nitroimidazoles. Biochemical Pharmacology, v. 35, n. 1, p. 59-61, 1986.

Delmas, F.; Gasquet, M.; Timon-David, P., et al. Synthesis and *in vitro* anti-protozoan activity os new 5-nitrothiophenes oxime ether derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 28, p. 23-27, 1993.

Dodd, M.C.; Stillman, W.B. The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. The Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics, v. 82, n. 1, p. 11-18, 1944.

Edwards, D. I. Reduction of Nitroimidazoles *in vitro* and DNA Damage. Biochemical Pharmacology, v. 35, n. 1, p. 53-58, 1986.

Edwards, D. I. Nitroimidazole Drug – action and resistance mechanisms. I. Mechanism of Action, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 31, p. 09-20, 1993.

Gayral, M. C., Rigothier, J. C., Gantier R. C., et al. Comparaison des activités antiparasitaires de deux séries d'aldimines des nitro-5-furanne et thiophène. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 16, n. 2, p. 151-155, 1981.

Goldman, P., Koch, R. L., Yeung, T., Ewan, J. T., Beaulieu, B. M., Martha, A., Sudlow, G. Comparing the Reduction of Nitroimidazoles in Bacteria and Mammalian Tissues and Relating it to Biological Activity. Biochemical Pharmacology, v. 35, n. 1, p. 43-51, 1986.

Goodman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor, P. The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th ed. McGraw-Hill, 2000.

Gringauz, A. Introduction to Medicinal Chemistry – How Drugs Act and Why, Wiley-VCH, Inc., 1997.

Hammett, L. P. The effect of structure upon the reactions of organic compounds benzene derivatives. Journal of the American Chemical Society, v. 59, n.1, p. 96-103, 1937.

Hancock, C. K., Meyers, E. A., Yager, B. J. Quantitative Separation of Hyperconjugation Effects from Steric Substituent Constants. Journal of the American Chemical Society, v. 83, p. 4211-4213, 1961.

Hancock, C. K., Falls, C. P. A Hammett-Taft Polar-Steric. Equation for the Saponification Rates of m- and p-Substituted Alkyl Benzoates. Journal of the American Chemical Society, v. 83, p. 4214-4216, 1961.

Hancock, C. K., Hwang, P. T. R. Study of the Alkaline Hydrolysis and Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Some Thiol Esters. *Journal of Organic Chemistry*, v. 38, p. 4239-4243, 1973.

Hansch, C., Fujita, T. ρ - σ - π analysis: A method for correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, v. 86, p. 1616-1626, 1964.

Hansch, C., Dunn, W. J. Linear Relationships between lipophilic character and biological activity of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 61, n. 1, p. 1-19, 1972.

Hansch, C. On the Structure of Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 1, p. 1-6, 1976.

Hansch, C., Sammes, P. G., Taylor, J. B. *Comprehensive Medicinal Chemistry. The Rational Design, Mechanistic Study & Therapeutic Application of Chemical Compounds. Volume 4. Quantitative Drug Design*, Pergamon Press, 1990.

Hansch, C.; Leo, A., Hoekman, D. *Exploring QSAR Vol. 1: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology. Vol. 2: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*. American Chemical Society Publisher, 1995.

Idoux, J. P., Schreck, J. O. Alkaline Hydrolysis of Methyl Carboxylate, Alkyl Acetates, and Alkyl Carboxylates. Steric Effects in Carboxylic Acid Derivatives and Related Systems. *Journal of Organic Chemistry*, v. 43, p. 4002-4007, 1978.

Ingold, C. K. The Mechanism of, and Constitutional factors controlling, the Hydrolysis of Carboxylic Esters. Part I. The Constitutional Significance of Hydrolysis Stability Maxima. *Journal of the Chemical Society*, p. 1032-1039, 1930.

Ingold, C. K. The Mechanism of, and Constitutional factors controlling, the Hydrolysis of Carboxylic Esters. Part II. Hydrolytic Stability Maxima of Some Glyceric Esters, *Journal of the Chemical Society*, p. 1039-1057, 1930.

Kapus, H. Overview of Enzyme Systems Involved in Bio-Reduction of Drugs and In Redox Cycling. *Biochemical Pharmacology*, v. 35, n. 1, p. 01-06, 1986.

Korolkovas, A. *Essentials of Medicinal Chemistry*, 2^a ed., Wiley-Interscience Pub., 1988.

Kubinyi, H., Kehrahn, O. H. Quantitative structure-activity relationships. 1. The modified free-Wilson approaches. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 578-586, 1976.

Kubinyi, H., Kehrahn, O. H. Quantitative structure-activity relationships. 2. a mix approach, based on Hansch and free-Wilson analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 587-600, 1976.

Kubinyi, H., Kehrahn, O. H. Quantitative structure-activity relationships. 3. A comparison of different free-Wilson models. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 1040-1049, 1976.

Kubinyi, H. *Hansch Analysis and Related Approaches*, Wiley-VCH, New York, 1993.

MacPhee, J. A., Panaye, A.; Dubois, J.-E. Steric Effects I – A critical examination of the Taft Steric Parameter – E_s . Definition of a revised, broader and homogeneous scale. Extension to highly congested alkyl groups. *Tetrahedron*, v. 34, p. 3553-3562, 1978.

Mannhold, R., Rekker, R. F. The hydrophobic fragmental constant approach for calculating log P in octanol / water and aliphatic hydrocarbon/water systems. *Perspective in Drug Discovery and Design*, v. 18, p. 1-18, 2000.

Masunari, A. Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR-2D e QSAR-3D de derivados 5-nitro-tiofilidênicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente (CEB-Clone Endêmico Brasileiro), Tese de Doutorado, Conjunto das Químicas – USP, 2005.

Masunari, A., Tavares, L. C. Aplicação de estudos de QSAR-2D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente (MRSA). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 203-213, 2006.

Metwally, K. A., Lobna M., et al. Hydrazones of 2-aryl-quinoline-4-carboxylic acid hydrazides: Synthesis and preliminary evaluation as antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 8675-8682, 2006.

Morrison, R. T., Boyd, R. N. *Química Orgânica*, 5ª Edição, Addison Wesley Iberoamericana, 1997.

Müller, M. Reductive Activation of Nitroimidazoles in Anaerobic Microorganisms. *Biochemical Pharmacology*, v. 35, n. 1, p. 37-41, 1986.

National Committee for Clinical Laboratory Standards - M7-A6, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standards, Sixth Edition.

Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 2ª Ed., Oxford University Press, 2001.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. *Introduction to Spectroscopy*, Second Edition, Harcourt Brace College Publishers, 1996.

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. *Farmacologia*, 4ª ed. Editora Guanabara-Koogan, 2001.

Reisdorfer, F. P. QSPR/SAR em derivados 5-nitro-heterocíclicos com atividade anti-chagásica. Estudo das relações entre o potencial de redução do grupo nitro e

propriedades físico-químicas, Tese de Doutorado, Conjunto das Químicas – USP, 2007.

Rekker, R. F., DeKort, H. M. The hydrophobic fragmental constant: an extension to a 1000 data-point set. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 479-488, 1979.

Rekker, R. F.; Mannhold R. Calculation of Drug Lipophilicity. *The Hydrophobic Fragmental Constant Approach*, VCH Weinheim, 1992.

Rezende, P. Relações quantitativas estrutura-atividade de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos: planejamento, síntese e determinação da atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, Conjunto das Químicas – USP, 2002.

Rollas, S., Gulerman, N., Habibe, E. Synthesis and antimicrobial activity of some new hydrazones of 4-fluorobenzoic acid hydrazide and 3-acetyl-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazolines. *Il Farmaco*, v. 57, p. 171-174, 2002.

Rowland, I. R. Reduction by the Gut Microflora of Animals and Man. *Biochemical Pharmacology*, v. 35, n. 1, p. 27-32, 1986.

Seydel, J. K. *QSAR and Strategies in the Design of Bioactive Compounds*, Wiley-VCH Publishers, 1985.

Sievert, D. M. National Nosocomial Infections Surveillance Report, data summary from October 1986 – April 1996, issued May 1996. CDC – Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA. *American Journal of Infection Control*, v. 24, p. 380-388, 1996.

Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 2^a Ed., Elsevier Academic Press, 2004.

Smith, H. J., Williams, H. Smith and Williams' *Introduction to the Principals of Drug Design*, Second Edition, 1988.

Solomons, G., Fryhle, C. *Organic Chemistry*, 7th Edition, John Wiley & Sons, 2000.

Spielberg, S. P., Gordon, G. B. Nitrofurantoin cytotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*, v. 67, p. 37-71, 1981.

Swain, C. G., Lupton, E. C. Jr. Field and Resonance Components of Substituent Effects. *Journal of the American Chemical Society*, v. 90, p. 4328-4337, 1968.

Swain, C. G., Unger, S. H., Rosenquist, N. R., Swain, M. S. Substituent Effects on Chemical Reactivity. Improved Evaluation of Field and Resonance Components. *Journal of the American Chemical Society*, v. 105, p. 492-502, 1983.

Swain, C. G. Substituent and Solvent Effects on Chemical Reactivity. *Journal of Organic Chemistry*, v. 49, p. 2005-2010, 1984.

Taft, R. W. Jr. Polar and Steric Substituent Constants for Aliphatic and *o*-Benzoate Groups from Rates of Esterification and Hydrolysis of Esters. *Journal of the American Chemical Society*, v. 74, p. 3120-3128, 1952.

Taft, R. W. Jr., Lewis, I. C. The General Applicability of a Fixed Scale of Inductive Effects. II. Inductive Effects of Dipolar Substituents in the Reactivities of *m*- and *p*-Substituted Derivatives of Benzene. *Journal of the American Chemical Society*, v. 80, p. 2436-2443, 1958.

Taft, R. W. Jr., Lewis, I. C. Evaluation of Resonance Effects on Reactivity by Application of the Linear Inductive Energy Relationship. V. Concerning a σ_R Scale of Resonance Effects. *Journal of the American Chemical Society*, v. 81, p. 5343-5352, 1959.

Taft, R. W. Jr., Ehrenson, S., Lewis, I. C., Glick, R. E. Evaluation of Resonance Effects on Reactivity by Application of the Linear Inductive Energy Relationship. VI. Concerning the Effects of Polarization and Conjugation on the Mesomeric Order. *Journal of the American Chemical Society*, v. 81, p. 5352-5361, 1959.

Taft, R. W. Jr. Sigma Values from Reactivities. *Journal of Physical Chemistry*, v. 64, p. 1805-1815, 1960.

Taft, R. W. Jr., Grob, C. A. Concerning the Separation of Polar and Resonance Effects in the Ionization of 4-Substituted Pyridinium Ions. *Journal of the American Chemical Society*, v. 96, p. 1236-1238, 1974.

Tavares, L. C. Relações Quantitativas entre a Estrutura Química e a Atividade Antimicrobiana de Análogos à nifuroxazida, Tese de Doutorado, Conjunto das Químicas – USP, 1993.

Tavares, L. C. QSAR: A abordagem de Hansch. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

Tocher, J. H. Reduction Activation of Nitroheterocyclic Compounds. *General Pharmacology*, v. 28, n. 4, p. 485-487, 1997.

Trabulsi, L.R., Alterthum, F., Gompertz, O. F., Candeias, J. A. *Microbiologia*, 3ª ed. Ed. Atheneu, 2002.

Vicini, P., Geronikaki, A., Anastásia, K., et al. Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-thiazolylimino-5-arylidene-4-thiazolidinones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 3859-3864, 2006.

Viodé, C., Bettache, N., Cenas, N., Krauth-Siegel, R. L., Chauvière, G., Bakalara, N., Périé, J. Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles. *Biochemical Pharmacology*, v. 57, p. 549-557, 1999.

Wells, P. R., et al. *Programme Physic Organic Chemistry*, v. 6, 147, 1968.

Wermuth, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry, Second Edition, Elsevier Academic Press, 2003.

Whitmore, G. F., Varghese, A. J. The Biological Properties of Reduced Nitroheterocyclics and Possible Underlying Biochemical Mechanisms. Biochemical Pharmacology, v. 35, n. 1, p. 97-103, 1986.

Williams, D. A., Lemke, T. L. FOYE's Principals of Medicinal Chemistry, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

Wilson, C. O., Delgado, J. N., Remers, W. A. Wisons and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 10th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 1998.

Zhenhua, S., Reiner, J., Junbiao, C., Zhao, K. Oxidative cyclization of aldazines with bis(trifluoroacetoxy)iodobenzene. Tetrahedron Letters, v. 46, p. 2701-2704, 2005.

ANEXO 1 – ESTRUTURAS QUÍMICAS E ESPECTROS

Espectro de Absorção na região do Infra-Vermelho de **2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-5-fenil-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolina** em pastilha de KBr.

Estrutura Química

Espectro de RMN- ^1H de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-fenil-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa
(sinais em ppm)

Espectro de RMN- ^{13}C de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-fenil-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO- d_6

Abaixo seguem ampliações
do espectro para as bandas
alta e baixa (sinais em ppm)

Espectro de Absorção na região do Infra-Vermelho de **2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-5-[4-trifluor-metil-fenil]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolina** em pastilha de KBr.

Estrutura Química

Espectro de RMN- ^1H de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-trifluor-metil-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa
(sinais em ppm)

Espectro de RMN- ^{13}C de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-trifluor-metil-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO- d_6

Abaixo seguem ampliações
do espectro para as bandas
alta e baixa (sinais em ppm)

Espectro de Absorção na região do Infra-Vermelho de **2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-5-[4-metil-fenil]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolina** em pastilha de KBr.

Estrutura Química

Espectro RMN- ^1H de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-metil-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro RMN- ^{13}C de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-metil-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro de Absorção na região do Infra-Vermelho de **2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-5-[4-etil-fenil]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolina** em pastilha de KBr.

Estrutura Química

Espectro RMN- ^1H de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-etil-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO- d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro RMN- ^{13}C de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-etil-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro de Absorção na região do Infra-Vermelho de **2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-5-[4-n-propil-fenil]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolina** em pastilha de KBr.

Estrutura Química

Espectro RMN- ^1H de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-n-propil-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro de RMN- ^{13}C de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-n-propil-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em $\text{DMSO}-d_6$
Abaixo seguem ampliações
do espectro para as bandas
alta e baixa (sinais em ppm)

Espectro de Absorção na região do Infra-Vermelho de **2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-5-[4-metoxi-fenil]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolina** em pastilha de KBr.

Estrutura Química

Espectro RMN- ^1H de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-metoxi-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO- d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro RMN- ^{13}C de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-metoxi-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro de Absorção na região do Infra-Vermelho de **2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-5-[4-etoxi-fenil]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolina** em pastilha de KBr.

Estrutura Química

Espectro RMN- ^1H de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-etoxi-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro RMN- ^{13}C de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-etoxi-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO- d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro de Absorção na região do Infra-Vermelho de **2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-5-[4-n-propoxi-fenil]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolina** em pastilha de KBr.

Estrutura Química

Espectro RMN- ^1H de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-n-propoxi-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em $\text{DMSO}-d_6$

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro de RMN- ^{13}C de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-n-propoxi-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em $\text{DMSO}-d_6$

Abaixo seguem ampliações
do espectro para as bandas
alta e baixa (sinais em ppm)

Espectro de Absorção na região do Infra-Vermelho de **2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-5-[4-cloro-fenil]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolina** em pastilha de KBr.

Estrutura Química

Espectro RMN- ^1H de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-cloro-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO- d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro RMN- ^{13}C de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-cloro-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro de Absorção na região do Infra-Vermelho de **2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-5-[4-iodo-fenil]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolina** em pastilha de KBr.

Estrutura Química

Espectro RMN- ^1H de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-iodo-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em $\text{DMSO}-d_6$

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro RMN- ^{13}C de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-iodo-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro de Absorção na região do Infra-Vermelho de **2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-5-[4-isopropil-fenil]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolina** em pastilha de KBr.

Estrutura Química

Espectro RMN- ^1H de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-isopropil-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Espectro RMN- ^{13}C de
2-[5-nitro-tiofeno]-3-acetil-
5-[4-isopropil-fenil]-2,3-dihidro-
1,3,4-oxadiazolina em DMSO-d_6

Abaixo seguem ampliações
e análises do espectro para
as bandas alta e baixa.
(sinais em ppm)

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na data.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

9135 - 2959789/1 - Leonardo Viana de Almeida

e-mail: leovs@terra.com.br

Data de Nascimento: 26/11/1979

Cédula de Identidade: RG - 22.925.631-4 - SP

Local Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico - Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2005

Curso: Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área: Tecnologia Químico-Farmacêutica - 9135

Data da Matrícula: 07/02/2006

Início da Contagem de Prazo: 07/02/2006

Data Limite: 05/12/2008

Orientador(es): Prof(a). Dr(a). Leoberto Costa Tavares - 07/02/2006 e-mail: leoberto@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/02/2006

Prorrogação: 120 dias - Período de 07/08/2008 a 05/12/2008

Exame de Qualificação: Aprovado em 07/02/2008

Data do Depósito do Trabalho: 03/12/2008

Data máxima para aprovação da Banca:

Título do Trabalho: Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas frente à cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*.

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa: 12/02/2009

Resultado da Defesa: Aprovado

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

9135 - 2959789/1 - Leonardo Viana de Almeida

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
FBT5715-5	Complementos de Matemática Aplicada para Biotecnologia	01/03/2006	27/04/2006	120	8	100.00	A	N	Concluída
FBF5737-3	Farmacocinética Básica II	03/05/2006	06/06/2006	75	5	85.00	A	N	Concluída
MAE5755-5	Métodos Estatísticos Aplicados às Ciências Biológicas	07/08/2006	24/11/2006	120	8	75.00	B	N	Concluída
FBT5737-5	Tecnologia de Síntese de Fármacos	11/08/2006	12/10/2006	90	6	100.00	A	N	Concluída
FBA5728-2	Aprimoramento Didático	05/06/2007	02/07/2007	60	4	75.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	25	25	Disciplinas:	31
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0
Total:	25	25		31

Créditos Atribuídos à Dissertação : 71

Conceito até 31/12/1996:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a (15) horas de atividade programada.