UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

**Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de
derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos e de derivados
5(6)-benzofuroxânicos frente a cepas padrão e
multirresistentes de *Staphylococcus aureus***

Salomão Dória Jorge

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares

São Paulo
2007

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

J82s Jorge, Salomão Dória
Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de derivados
5-metilsulfonyl-2-tiofilidênicos e de derivados 5(6)-benzofuroxânicos
frente a cepas padrão e multirresistentes de *Staphylococcus*
aureus / Salomão Dória Jorge. -- São Paulo, 2007.
137p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Tavares, Leoberto Costa

1. Relações estrutura-atividade(SAR) : Química farmacêutica
2. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 3. Síntese :
Química orgânica 4. Ensaios biológicos : Farmacologia 1.
T. II. Tavares, Leoberto Costa, orientador.

615.19 CDD

Salomão Dória Jorge

**Síntese e avaliação da atividade antibacteriana de derivados
5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos e de derivados
5(6)-benzofuroxânicos frente a cepas padrão e
multirresistentes de *Staphylococcus aureus***

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares
orientador/presidente

Prof. Dr. Geraldo Alécio de Oliveira
1º. examinador

Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui
2º. examinador

São Paulo, 12 de junho de 2007.

*Dedico este trabalho à minha mãe, ao meu pai, e ao meu irmão,
que sempre me apoiaram e acreditaram nesta caminhada.
Mesmo longe, eu pude sempre contar com esta família maravilhosa.
Amo muito vocês...*

*“Não há nada que atrapalhe mais o desenvolvimento científico
do que o desejo de que ele aconteça rápido demais”*

Georg Lichtenberg

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Leoberto Costa Tavares pela oportunidade que me foi dada, pela sua valiosa orientação durante todos os momentos, pela amizade, estímulo e confiança sempre demonstrados e que foram fundamentais para realização deste trabalho. À minha amiga Andrea Masunari, por todos os momentos, discussões científicas e não-científicas, por sempre me ajudar de forma tão solícita e atenciosa não apenas neste trabalho, mas na minha vida pessoal também. À Maria das Graças Baptista dos Santos, por repassar seus conhecimentos sobre ensaios biológicos e por sempre estar presente ao meu lado na realização deles. Aos meus colegas de laboratório: Ana Cláudia, Fabrício, Fávero, Hélio, Ieda, Leonardo Roque, Leonardo Viana, Luiz Fernando, Márcia, Marina Ishii, Marcos, Paula, Sibila, pela convivência e companheirismo desses últimos anos. À Prof^a. Elsa Mamizuka pela simpatia com que sempre me recebeu e pela gentileza de ceder as cepas resistentes utilizadas neste trabalho, e ao Dr. John McCulloch pela orientação na manipulação destas cepas. À Irene Machosvili pelas discussões sobre ensaios biológicos. À Dra. Maria Inês pela realização dos espectros e discussão dos espectros de RMN. Ao meu anjo, Simone, que me ajudou e esteve ao meu lado principalmente na reta final, sempre me apoiando e me inspirando. Ao Rodrigo Lima, mais que um amigo, meu brother, que participou dessa jornada inteira. À minha família que sempre torceu por mim, em especial à minha avó Célia (*in memoriam*) e minha avó Aline. A todos meus amigos que sempre me incentivaram e acreditaram que este momento iria chegar. À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Tecnologia Farmacêutica pela oportunidade de realização deste trabalho. Ao Jorge e Elaine, da secretária de pós-graduação, e, Miriam e Elza da secretaria do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela solicitude. A CAPES, FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro e novamente ao CNPq pela bolsa de estudos. A todos que de uma maneira direta ou indireta contribuíram ou não para que este trabalho se concretizasse.

Agradeço a Deus, por me guiar e sempre estar comigo nesta etapa de minha vida, e também, por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. JUSTIFICATIVA	5
4. REVISÃO DA LITERATURA	7
4.1. Resistência Bacteriana	8
4.2. Relação Estrutura-Atividade	15
4.2.1. Propriedades físico-químicas que influenciam a ação de fármacos e parâmetros relacionados	18
4.2.1.1. Hidrofobicidade	18
4.2.1.1.1. Coeficiente de Partição	20
4.2.1.1.2. Parâmetro π de Hansch-Fujita	22
4.2.1.2. Efeito eletrônico	23
4.2.1.2.1. Parâmetro σ de Hammett	23
4.2.1.2.2. Constantes ρ e ρ' de Swain e Lupton	26
4.2.2. Escolha de grupos substituintes	27

4.3. Modificação Molecular	28
4.4. Nifuroxazida	32
5. PLANO DE TRABALHO	39
6. MATERIAIS E MÉTODOS	41
6.1. Materiais	42
6.1.1. Reagentes e solventes	42
6.1.2. Equipamentos	42
6.1.3. Microrganismos e meios de cultura	43
6.2. Métodos	43
6.2.1.1. Obtenção de benzoatos de metila	44
6.2.1.2. Obtenção de benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	44
6.2.2. Obtenção da série I	45
6.2.2.1. Obtenção de 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído	45
6.2.2.2. Obtenção de derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos	46
6.2.3. Obtenção da série II	46
6.2.3.1. Obtenção de 4-azido-3-nitrobenzaldeído	47
6.2.3.2. Obtenção de 5-formilbenzofuroxano	47
6.2.3.3. Obtenção de derivados 5(6)-benzofuroxânicos	48
6.2.4. Análise físico-químicas	48

6.2.4.1. Faixa de fusão	49
6.2.4.2. Espectroscopia na região do infravermelho	49
6.2.4.3. Espectroscopia de ressonância magnética	49
6.2.4.4. Análise elementar	49
6.2.5. Ensaio microbiológicos	50
6.2.5.1. Preparo dos meios de cultura	50
6.2.5.2. Preparo das soluções-mãe de compostos a serem testados	50
6.2.5.3. Preparo do inóculo	51
6.2.5.3.1. Preparo do inóculo da cepa ATCC25923	51
6.2.5.3.1. Preparo do inóculo das cepas 3SP/R33 e VISA3	51
6.2.5.4. Determinação da concentração inibitória mínima, CIM	52
7. RESULTADOS	54
7.1. Síntese e identificação dos compostos	55
7.1.1. Síntese de derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos (série I)	55
7.1.2. Síntese de derivados 5(6)-benzofuroxânicos (série II)	58
7.1.3. Identificação dos compostos	58
7.2. Ensaio microbiológicos	65
7.2.1. Determinação da concentração inibitória mínima frente à <i>Staphylococcus aureus</i> , cepa ATCC25923	65
7.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima frente à <i>Staphylococcus aureus</i> , cepas 3SP/R33 e VISA3	66

8. DISCUSSÃO	68
8.1. Síntese dos compostos	69
8.1.1. Obtenção de benzoatos de metila	69
8.1.2. Obtenção de benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	70
8.1.3. Síntese dos derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos (série I)	71
8.1.3.1. Obtenção de 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído	71
8.1.3.2. Obtenção de derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos	72
8.1.4. Síntese dos derivados 5(6)-benzofuroxânicos (série II)	74
8.1.4.1. Obtenção de 4-azido-3-nitrobenzaldeído	74
8.1.4.2. Obtenção de 5-formilbenzofuroxano	75
8.1.4.3. Obtenção de derivados 5(6)-benzofuroxânicos	76
8.2. Identificação dos compostos	77
8.3. Ensaios microbiológicos	80
8.3.1. Ensaio microbiológico frente a <i>Staphylococcus aureus</i> cepa ATCC25923	80
8.3.1. Ensaio microbiológico frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , cepas 3SP/R33 e VISA3	82
8.4. Relação estrutura-atividade dos compostos	85
9. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

ANEXO 1.	Procedimento experimental para o preparo de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas substituídas (série I) e 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas substituídas (série II)	102
ANEXO 2.	Estruturas químicas dos derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos (série I) e dos derivados 5(6)-benzofuroxânicos (série II)	110
ANEXO 3.	Espectros de IV, RMN-¹H e RMN-¹³C de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas substituídas (série I) e 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas substituídas (série II)	112

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Estruturas da parede celular que envolve a membrana citoplasmática de bactérias gram-positivas	11
FIGURA 2.	Receptor hipotético adrenérgico e as interações em regiões hidrofóbicas, íon-dipolo e de ligação de hidrogênio com epinefrina	16
FIGURA 3.	Modelo de mosaico fluido da membrana	19
FIGURA 4.	Grau de ionização e absorção passiva de ácidos ou bases fracas	20
FIGURA 5.	Reação de ionização de ácidos benzóicos <i>para</i> ou <i>meta</i> substituídos ...	24
FIGURA 6.	Diagrama de Craig	28
FIGURA 7.	Bioisosterismo clássico monovalente	32
FIGURA 8.	Grupo farmacofórico de compostos nitrofurânicos com atividade antimicrobiana	33
FIGURA 9.	Esquema da via bioreductiva de compostos nitro-heterocíclicos	35
FIGURA 10.	Estrutura química da nifuroxazida	36
FIGURA 11.	Estrutura química da nifuroxazida (A). Em destaque, os locais de modificação estrutural planejadas neste estudo. (B) derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos e (C) derivados 5(6)-benzofuroxânicos	39
FIGURA 12.	Esterificação dos ácidos benzóicos substituídos	44
FIGURA 13.	Reação de amonólise de ésteres substituídos	44
FIGURA 14.	Reação de obtenção do 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído a partir de 5-bromo-2-tiofenocarboxaldeído	45

FIGURA 15.	Reação de obtenção das 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas substituídas	46
FIGURA 16.	Obtenção de 4-azido-3-nitrobenzaldeído	47
FIGURA 17.	Reação de ciclocondensação de 4-azido-3-nitrobenzaldeído até formação do 5-formilbenzofuroxano	48
FIGURA 18.	Reação de obtenção de 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas substituídas	48
FIGURA 19.	Procedimento geral adotado na determinação da CIM	52
FIGURA 20.	Mecanismo de esterificação de Fischer	69
FIGURA 21.	Mecanismo de reação de amonólise	70
FIGURA 22.	Mecanismo de reação de substituição nucleofílica SN_2	71
FIGURA 23.	Reação de obtenção de bases de Schiff	73
FIGURA 24.	Mecanismo de reação nucleofílica aromática	74
FIGURA 25.	Complexo de Meisenheimer estabilizado por ressonância	75
FIGURA 26.	Mecanismo de ciclocondensação	75
FIGURA 27.	Equilíbrio tautomérico de derivados benzofuroxânicos	76
FIGURA 28.	Visualização do ensaio após 18 horas de incubação à 35°C	81
FIGURA 29.	Faixas de potenciais de redução para diferentes classes de nitrocompostos	84
FIGURA 30.	Tendência de correlação entre a potência antimicrobiana de derivados 5(6)-benzofuroxânicos, em função do coeficiente de partição calculado, ClogP	88
FIGURA 31.	Tendência de correlação entre a potência antimicrobiana de derivados 5(6)-benzofuroxânicos, em função do efeito eletrônico de <i>para</i> -substituintes expressos através do parâmetro σ de Hammet	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Relatos de resistência a novos agentes antimicrobianos e data de aprovação para uso clínico	9
TABELA 2.	Interações moleculares de um fármaco com seu receptor e correspondentes propriedades moleculares e parâmetros descritores envolvidos	17
TABELA 3.	Bioisósteros clássicos e bioisósteros não-clássicos	31
TABELA 4	Compostos nitrofurânicos utilizados atualmente na farmacoterapia humana	34
TABELA 5.	Síntese de benzoatos de metila <i>para-R</i> -substituídos	56
TABELA 6.	Síntese de benzidrazidas <i>para-R</i> -substituídas	57
TABELA 7.	Síntese de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas <i>para-R</i> -substituídas	57
TABELA 8.	Síntese de 5(6)-benzofuroxano benzidrazidas <i>para-R</i> -substituídas ...	58
TABELA 9.	Principais bandas de absorção (cm^{-1}) na região do Infravermelho de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	59
TABELA 10.	Principais sinais de RMN- ^1H (ppm) em DMSO – d_6 de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	60
TABELA 11.	Principais sinais de RMN- ^{13}C (ppm) em DMSO – d_6 de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	61
TABELA 12.	Principais bandas de absorção (cm^{-1}) na região do Infravermelho de 5(6)-benzofuroxano benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	62
TABELA 13.	Principais sinais de RMN- ^1H (ppm) em DMSO – d_6 de 5(6)-benzofuroxano benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	63
TABELA 14.	Principais sinais de RMN- ^{13}C (ppm) em DMSO – d_6 de 5(6)-benzofuroxano benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	64
TABELA 15.	Concentração inibitória mínima, CIM, de derivados 5(6)-benzofuroxânicos frente à <i>Staphylococcus aureus</i> , cepa ATCC25923	66
TABELA 16.	Concentração inibitória mínima, CIM, de derivados 5(6)-benzofuroxânicos frente à <i>Staphylococcus aureus</i> multi-resistente, cepas 3SP/R33 e VISA3 ..	67

TABELA 17.	Rendimentos parciais e totais das etapas de preparação de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas <i>para-R</i> -substituídas	73
TABELA 18.	Rendimentos parciais e totais das etapas de preparação de 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas <i>para-R</i> -substituídas	77
TABELA 19.	Atribuições para as principais bandas de absorção na região do IV de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	78
TABELA 20.	Atribuições para os principais sinais observados no espectro de RMN- ¹ H de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	78
TABELA 21.	Atribuições para os principais sinais observados no espectro de RMN- ¹³ C de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	79
TABELA 22.	Atribuições para as principais bandas de absorção na região do IV de 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	79
TABELA 23.	Atribuições para os principais sinais observados no espectro de RMN- ¹ H de 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	80
TABELA 24.	Atribuições para os principais sinais observados no espectro de RMN- ¹³ C de 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas <i>para</i> -substituídas ..	80
TABELA 25.	Espectro de multi-resistência das cepas 3SP/R33 e VISA3 de <i>Staphylococcus aureus</i> utilizadas na avaliação antimicrobiana de derivados 5(6)-benzofuroxânicos	84
TABELA 26.	Concentração inibitória mínima de 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas <i>p</i> -substituídas frente às cepas ATCC 25923, 3SP/R33 e VISA3 de <i>Staphylococcus aureus</i>	85
TABELA 27.	Concentração inibitória mínima, CIM, frente à cepa ATCC 25923 de <i>Staphylococcus aureus</i> , coeficiente de partição* e efeito eletrônico (σ) do grupo substituinte em 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas <i>para</i> -substituídas	87

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AB: atividade biológica

ATCC: *American Type Culture Collection*

CA-MRSA: Community-Acquired - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

CCD: cromatografia em camada delgada

CIM: concentração inibitória mínima

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

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

DMF: dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DMSO-d6: dimetilsulfóxido deuterado

F: nível de significância de Fisher

FDA: *Food and Drug Administration*

f.f.: faixa de fusão

IV: infravermelho

log 1/C: potência antimicrobiana

MRSA: *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

MIC: *minimum inhibitory concentration*

P = coeficiente de partição

PBP: *Penicilin Binding Protein*

PCA: *Plate Count Agar*

RMN-¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN-¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

TMS: trimetilsilano

TSB: *Tryptic Soy Broth*

UFC: unidade formadora de colônia

UV: ultravioleta

V: volts

VISA: *vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*

VRSA: *vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*

π : constante de hidrofobicidade

σ : constante de Hammet

$\mathcal{J}$ = constante de campo de Swain e Lupton

$\mathcal{H}$ = constante de ressonância de Swain e Lupton

ρ : constante de reação

η : rendimento

RESUMO

A emergência de resistência microbiana é um desafio para microbiologistas, médicos, órgãos de saúde pública e para a indústria farmacêutica. Passado três décadas, patógenos gram-positivos, principalmente *Staphylococcus aureus*, têm desenvolvido cada vez mais resistência a vários antibióticos devido ao uso extensivo nos hospitais e na comunidade. Este desenvolvimento aconteceu em um período em que poucas novas classes de antibióticos tenham sido identificadas, ressaltando a necessidade urgente de novos agentes antimicrobianos. A modificação molecular tem se mostrado como estratégia bastante promissora no planejamento e desenvolvimento de análogos com melhor biodisponibilidade, maior atividade intrínseca e menor toxicidade. Desta forma, foi planejada, neste trabalho, a síntese de série de derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos e derivados 5(6)-benzofuroxânicos, análogos à nifuroxazida, buscando atividade bacteriostática e/ou bactericida frente a cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*. A seleção dos grupos substituintes foi fundamentada na influência de suas propriedades físico-químicas, como hidrofobicidade e efeito eletrônico. Para avaliação da atividade antibacteriana, este trabalho usou o método de determinação da concentração inibitória mínima, CIM, frente à *Staphylococcus aureus*, cepas ATCC25923, 3SP/R33 e VISA3. Os derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos não apresentaram atividade antimicrobiana, enquanto que todos os derivados 5(6)-benzofuroxânicos foram ativos frente a cepa padrão ATCC25923. O composto mais ativo foi a 5(6)-benzofuroxano-4-nitrobenzidrazida (CIM= 16,80µg/mL) e o menos ativo foi a 5(6)-benzofuroxano benzidrazida (CIM = 36,00µg/mL). Ficou evidenciado que a atividade antimicrobiana destes compostos sofre forte influência da hidrofobicidade e do efeito eletrônico dos grupos substituintes. Os compostos 5(6)-benzofuroxano-4-nitrobenzidrazida e 5(6)-benzofuroxano-4-clorobenzidrazida foram testados frente às cepas com caráter de multi-resistência, 3SP/R33 e VISA3, e ambos mostraram atividade antimicrobiana similar quando comparados com a cepa padrão. Ressalta-se que foram sintetizados e identificados neste trabalho onze compostos que apresentam estruturas químicas inéditas.

ABSTRACT

Emergent antimicrobial resistance is a challenge for microbiologists, physicians, public health organizations, and pharmaceutical industry. Over the past three decades Gram-positive pathogens, most notably *Staphylococcus aureus*, have become increasingly resistant to multiple antibiotics due to their extensive hospital and community use. This has come at time when very few new antibiotic classes have been identified, and emphasizes the urge for new antibacterial agents. Molecular modification has been used as a quite promising strategy in the design and development of drug analogs with better bioavailability, higher intrinsic activity, and lesser toxicity. Thus, for this work a series of 5-methylsulfonyl-2-thiophylidene and 5(6)-benzofuroxans derivatives were synthesized and tested for antibacterial activity against resistant *Staphylococcus aureus* strains. The selection of the substituent groups was based on the influence of physical-chemical properties, such as hydrophobicity and electronic effects. Antibacterial activity was evaluated through the determination of the minimum inhibitory concentration, MIC, against *Staphylococcus aureus* strains ATCC25923, 3SP/R33 and VISA3. 5-methylsulfonyl-2-thiophylidene derivatives did not show antibacterial activity, while all 5(6)-benzofuroxans derivatives were active against the standard strain ATCC25923. *4-nitro-benzoic acid(((5(6)benzo[c][1,2,5]oxadiazole N₁-oxide)-2-yl)-methylene]-hydrazide* (MIC=16,80µg/mL) was the most active compound, and the least active was *benzoic acid(((5(6)benzo[c][1,2,5]oxadiazole N₁-oxide)-2-yl)-methylene]-hydrazide* (MIC = 36,00µg/mL). It was evidenced that the antimicrobial activity of these compounds is influenced by the hydrofobicity and electronic effects of substituent groups. Compounds *4-nitro-benzoic acid(((5(6)benzo[c][1,2,5]oxadiazole N₁-oxide)-2-yl)-methylene]-hydrazide* and *4-Chloro-benzoic acid(((5(6)benzo[c][1,2,5]oxadiazole N₁-oxide)-2-yl)-methylene]-hydrazide* were evaluated against the resistant strains 3SP/R33 and VISA3, and both showed similar antimicrobial activity when compared to the standard strain. It must be pointed out that eleven previously unknown compounds were synthesized and tested in this work.

Introdução

Um dos maiores problemas quanto ao uso inadequado de fármacos antimicrobianos é a seleção de microrganismos multirresistentes, que limita as possibilidades terapêuticas e aumenta não só as taxas de morbidade, como também os custos de tratamento (Owens, Rice, 2006).

O surgimento de cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* – MRSA) se constitui, atualmente, como problema relevante no controle de infecções. Cepas MRSA têm sido apontadas como sendo o principal patógeno causador de infecções hospitalares graves (Sakoulas *et al.*, 2006; Finch, Hunter, 2006; Oliveira *et al.*, 2001). Ressalta-se que o problema se agrava em função desta bactéria ser facilmente transmitida entre pacientes e através de pessoas que freqüentam o ambiente hospitalar (Nakao, Senda, 2006; Lopes, 2005; Oliveira *et al.*, 2001). Com isso, observa-se que os antibióticos atualmente disponíveis estão tornando-se ineficazes frente às cepas resistentes, o que determina a necessidade de busca contínua por novos fármacos que sejam mais eficazes frente às infecções com caráter de multirresistência (Owens, Rice, 2006).

Com a atenção voltada para o referido problema, este trabalho visa à obtenção de compostos análogos à nifuroxazida, *5-nitro-2-furfurilideno 4-hidroxi-benzidrazida*, fármaco utilizado nos anos 70 e 80, como primeira ou segunda escolha, no tratamento de infecções intestinais (Hardman, Limbird, Gilman, 2001). A nifuroxazida apresenta características que propiciam o emprego de métodos de modificação molecular (Masunari, Tavares, 2007; 2006), que torna este fármaco, um composto líder para a busca de análogos com melhor biodisponibilidade, maior atividade intrínseca e menor toxicidade, para, com isso, identificar novos antimicrobianos potencialmente aproveitáveis no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus* com caráter de multirresistência.

Objetivo

Este trabalho tem como objetivo o planejamento, síntese, identificação e avaliação da atividade antimicrobiana de derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos e de derivados 5(6)-benzofuroxânicos – série I e série II respectivamente, com estruturas análogas à nifuroxazida, *5-nitro-2-furfurilideno 4-hidroxibenzidrazida*, buscando identificar novos compostos potencialmente ativos frente à cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*. Pretende-se, também, estudar e avaliar a influência das propriedades físico-químicas de grupos substituintes sobre a atividade antimicrobiana dos compostos obtidos.

Justificativa

No início do século XX, a descoberta de agentes antimicrobianos representou um marco na medicina. Com a introdução da penicilina e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, as infecções bacterianas jamais imaginadas curáveis, foram tratadas. Porém, logo começaram os primeiros relatos de resistência das bactérias a estes fármacos. Atualmente, cepas com caráter de multirresistência a diversos antimicrobianos estão espalhadas por todo o mundo (Norwark, Norwark, 2002).

A resistência a um grande número de antibióticos apresentada por cepas de *Staphylococcus aureus* torna difícil o controle de infecções causadas por esse microrganismo, principalmente em pacientes hospitalizados (Norrby, Nord, Finch, 2005; Rubinovitch, Pittet, 2001). Já existem cepas deste patógeno que adquiriram resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos, além de macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina, clotrimoxazol e quinolonas, e até mesmo à vancomicina (Hiramatsu *et al.* 2002).

A proliferação de infecções com caráter de multirresistência tem afetado grande parte da população mundial e tem levado a incessante busca, por parte da comunidade científica, de novos fármacos com estrutura química inédita ou obtidos por modificação estrutural daqueles já disponíveis, visando a identificação de novos caminhos no combate a microrganismos multirresistentes.

A modificação molecular de um fármaco já conhecido tem por objetivo melhorar as suas características físico-químicas e farmacológicas, uma vez que modificações estruturais podem conduzir a melhorias na estabilidade, solubilidade e absorção no organismo, o que pode resultar em melhor perfil farmacológico (Barreiro *et al.*, 2002; Chung, Ferreira, 1999).

Revisão da Literatura

4.1. RESISTÊNCIA BACTERIANA

A introdução de agentes antimicrobianos na terapêutica representou um dos maiores avanços da medicina moderna. Na última metade do século XX, um grande número de agentes antimicrobianos foi desenvolvido e utilizado na clínica médica, possibilitando desta forma, o tratamento de diversos tipos de doenças infecciosas. O surgimento de resistência microbiana, entretanto, também acompanhou este desenvolvimento, desde o começo, detectando-se atualmente, cepas resistentes às diversas classes de antibióticos (Normark, Normark, 2002). Paralelamente, observa-se, em tempos mais recentes, taxa crescente de resistência de microrganismos previamente susceptíveis, bem como a emergência de microrganismos intrinsecamente resistentes (Normark, Normark, 2002), especialmente em pacientes imunocomprometidos (Tumbarello *et al.*, 2002).

Acreditava-se que o desenvolvimento de resistência bacteriana ocorria apenas em consequência de mutações randômicas que alteravam os sítios de ligações dos fármacos. Entretanto, à medida que este fenômeno apareceu em diversas espécies de bactérias, comprovou-se a existência de outros mecanismos de resistência (Black, 2002; Lee, Scott, 1999). Este fenômeno pode ser classificado em intrínseco, adquirido ou genético (Black, 2002). O mecanismo intrínseco ocorre quando o fármaco não encontra seu sítio de ação na parede celular e membrana do microrganismo ou quando este fármaco não consegue atravessar estas estruturas para alcançar seu sítio de ação. Isto ocorre pela alteração da composição da parede ou da membrana celular, e pode ocorrer independentemente da exposição deste microrganismo ao antibiótico (Trabulsi, 2005; Black, 2002). A resistência adquirida envolve a indução de resistência temporária provocada, por exemplo, pela exposição do microrganismo ao antibiótico, sem ocorrer modificação no código genético desta bactéria, ou seja, quando não houver mais a exposição ao antibiótico, este microrganismo recuperará sua suscetibilidade (Black, 2002; Brachman, Bennett, 1998). A resistência genética ocorre quando o microrganismo se torna resistente por meio de mutação cromossômica ou por aquisição de material genético mediado por plasmídeos, transposons ou outro material

extracromossômico (Black, 2002; Normark, Normark, 2002). Algumas bactérias podem mudar a informação genética por meio de fenômenos como transformação, transdução ou conjugação (Tortora, Funke, Case, 2005; Trabulsi, 2005, Black, 2002, Brachman, Bennett, 1998).

Logo após um agente antimicrobiano ser aprovado para uso clínico, houve relatos de resistência bacteriana em pelo menos um microrganismo, tabela 1.

TABELA 1
Relatos de resistência a novos agentes antimicrobianos e data de aprovação para uso clínico

Antimicrobiano	Aprovação pelo FDA	Relato de resistência
Penicilina G	1943	1940
Estreptomicina	1947	1947
Tetraciclina	1952	1952
Penicilina e tetraciclina (<i>Neisseria gonorrhea</i> e <i>enterobactérias</i>)	1943 e 1952	1976 – 1980
Meticilina (e todos beta-lactâmicos em <i>S. aureus</i>)	1960	1961
Ácido nalidíxico	1964	1966
Gentamicina	1967	1969
Cefotaxima	1981	1981 – 1983
Linezolida	2000	2001

Fonte: Bush, 2004

Analisando a tabela 1, percebe-se que os primeiros antibióticos são ou derivam de produtos naturais, e os fatores de resistência já existiam na fonte destes compostos. Assim, foi necessário somente um curto período de tempo para que estes fatores de resistência se manifestassem nos microrganismos tratados com os novos antibióticos (Bush, 2004).

Dentre os patógenos que causam infecções multirresistentes de caráter mais grave, o *Staphylococcus aureus* tem sido considerado como o mais importante. Esta bactéria acomete com frequência, pacientes hospitalizados, sendo esta uma causa significativa de morbidade e mortalidade. Assim, o grau e velocidade de resistência que este microrganismo vem desenvolvendo aos antibióticos atualmente disponíveis tem sido motivo de grande preocupação pelos órgãos de saúde (Gomes, West, Lencastre, 2006; Nakao, Senda, 2006; Spiandorello *et al.*, 2000).

Staphylococcus aureus são cocos gram-positivos, de tamanho variável entre 0,5 e 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporulados e capsulados. Podem aparecer isolados, aos pares, na forma de tétrades, cadeias curtas ou na forma de cachos irregulares. São anaeróbios facultativos, com metabolismo oxidativo e fermentativo, e utilizam carboidratos e aminoácidos como fontes de energia e carbono (Kloss, Bannerman, 2003).

A parede celular desses microrganismos envolve totalmente a membrana citoplasmática, figura 1. Tal parede mantém a forma e protege tais microrganismos que possuem uma alta pressão osmótica interna. A parede celular de *Staphylococcus aureus* contém glicopeptídeos (polímeros de N – acetilglicosamina e de ácido N – acetilmurâmico) ligados de forma cruzada, e ácidos teicóicos que são polímeros de ribitol (monossacarídeos de cinco carbonos) com fosfatos. Os ácidos teicóicos atuam na aderência específica das bactérias gram-positivas às superfícies mucosas (Koneman, 2001). A composição da ligação peptídica cruzada é típica de cada microrganismo e confere a rigidez final da parede celular. A espessura da camada de peptideoglicanos desta espécie de bactéria é de 50 a 100 moléculas enquanto que a de bactérias gram-negativas possui apenas uma ou duas (Kloss, Bannerman, 2003).

FIGURA 1: Estruturas da parede celular que envolve a membrana citoplasmática de bactérias gram-positivas.

Antes da descoberta dos antibióticos, a mortalidade por sepse devido ao *Staphylococcus aureus* alcançava mais de 80% dos indivíduos infectados (Skinner, Keefer, 1941).

Um dos primeiros antimicrobianos desenvolvidos para vencer essa bactéria foi a sulfonamida. Usada entre 1937 e 1942, em diversas infecções, porém não se mostrava eficaz nos casos de osteomielites causadas pelo *Staphylococcus aureus* (Spiandorello *et al.*, 2000). A partir de 1942, a penicilina passou a ser utilizada para o tratamento de humanos e rapidamente reduziu a mortalidade por sepses de 80% para 35% (Mayhall, 1995), tendo sido o primeiro antibiótico a ter sucesso no tratamento das infecções causadas por este microrganismo.

O mecanismo de ação da penicilina se deve à ligação desse fármaco a proteínas de ligação à penicilina (PBP – *Penicilin Binding Protein*), que são receptores celulares que existem em número de quatro (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4) nas espécies de *Staphylococcus aureus*. Diferentes PBPs podem exibir afinidades diferentes por determinado fármaco e cada um pode mediar um

modo particular de ação, como por exemplo a ligação da penicilina a uma PBP pode causar alongamento anormal da célula e a outra PBP pode resultar em lise celular (Mandell, Petri Jr, 1996). Os peptidoglicanos são sintetizados em três etapas sendo que a última, que culmina no término da formação da ligação cruzada, envolve uma transpeptidação por transpeptidase ligada à membrana. A ligação da penicilina as transpeptidases gera inibição dessa transpeptidação e, portanto, influi na síntese da parede celular. Essa inibição das transpeptidases parece decorrer da semelhança dos antibióticos beta-lactâmicos com a acil-D-alanil-D-alanina uma vez que a reação de transpeptidação envolve a perda de uma D-alanina do pentapeptídeo precursor do proteoglicano (Mandell, Petri Jr, 1996).

Porém, já em 1945, foram relatados casos de resistência microbiana, até então desconhecidos, que aumentaram de modo acentuado em hospitais que a usavam intensamente (Norrby, Nord, Finch, 2005; Spink, Ferris, 1945). O *Staphylococcus aureus* adquiriu resistência por meio de produção de penicilinase, enzima responsável pela ruptura do anel beta-lactâmico das penicilinas, cuja expressão genética é transmitida entre as cepas por transferência de plasmídeos (Gomes, West, Lencastre, 2006; Wenzel, Edmont, 1998).

Nas décadas de 1960 e 1970, surgiram as penicilinas semi-sintéticas para o combate dos *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina, contudo, já em 1961 (Jevons, 1961), havia relatos de casos de resistência aos novos antimicrobianos. As cepas resistentes receberam a denominação MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). O mecanismo de resistência à meticilina desenvolvido pelo *Staphylococcus aureus* está também relacionado com as PBPs. As cepas MRSA produzem uma PBP alterada de baixa afinidade para vários antibióticos beta-lactâmicos, denominada de PBP2a ou 2' (Utsui; Yakota, 1985). Uma vez inativadas por antibióticos beta-lactâmicos, a PBP2a tem a capacidade de suprir as funções destas PBPs normais. A PBP 2a pode ter sido originada pela fusão dos genes da beta-lactamase estafilocócica e do gene de PBP de outras bactérias e é codificada pelo gene *mecA* (Hiramatsu *et al.*, 2002). Esta PBP2a mostra baixa afinidade, não apenas à meticilina, mas

praticamente a todos os antibióticos beta-lactâmicos (McCulloch, 2006, Lopes, 2005).

As cepas MRSA se disseminaram rapidamente por todo o mundo. Nos Estados Unidos observou-se aumento nos casos de infecções atribuídas ao MRSA de 2,4%, em 1975, para 29% em 1991 (Panlilio, Culver, Gaynes, 1992); no País de Gales registraram aumento de 4% para 43% no período entre 1993 a 1997 (Spiandorello *et al.*, 2000), além da disseminação em outros países como Austrália (Torvaldsen, 1999), Bélgica (Crowcroft, 1999), Canadá (Nicolle *et al.*, 1999). A partir da década de 90, o MRSA já estava disseminado em grande parte do mundo, tornando-se uma das principais causas de infecções hospitalares (Lopes, 2005).

As infecções causadas pelo MRSA ocorriam exclusivamente em hospitais. Entretanto, nos últimos anos, infecções causadas pelo MRSA fora das comunidades nosocomias têm sido documentadas de forma crescente (Lopes, 2005). Salienta-se que estas infecções podem ocorrer em indivíduos saudáveis e sem nenhum fator de risco identificável. Estas cepas (CA-MRSA), relativas à comunidade ou adquiridas na comunidade (CA), não são epidemiologicamente relacionadas as cepas MRSA presentes em hospitais (Lopes, 2005), que têm, como fatores de risco, idade superior a 60 anos, uso de corticosteróides e uso prévio de antibióticos. As CA-MRSA são identificadas por ocorrerem em pacientes que não foram hospitalizados no ano anterior e que não se submeteram a procedimentos médicos (Rybak, Le Plante, 2005).

No início da década de 90 foram relatados os primeiros casos de infecções por CA-MRSA que ocorreram entre aborígenes australianos e nativos americanos no Canadá. Posteriormente, estas infecções se propagaram resultando em diversos surtos, tanto nos Estados Unidos como em diversos outros países (Palavecino, 2005). A conduta terapêutica frente a infecções causadas pelo CA-MRSA ainda não foi adequadamente estabelecida, porém antimicrobianos como sulfametoxazol-trimetoprim, clindamicina, tetraciclina, fluoroquinolonas e novos antimicrobianos podem ser utilizados (Kluytmans-

Vandenbergh, Kluytmans, 2006). Este agente é habitualmente sensível a ampla variedade de antibióticos não-beta-lactâmicos (Lopes, 2005).

A resistência a um grande número de antibióticos apresentada pelo MRSA torna difícil o controle deste microrganismo no ambiente hospitalar (Rubinovich, Pittet, 2001; Folorunso *et al.*, 2000). Além da resistência cruzada a todos os antibióticos beta-lactâmicos, o MRSA adquiriu resistência aos macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifampicina, clotrimoxazol e quinolonas (Hiramatsu *et al.*, 2002), restando os glicopeptídeos como uma das poucas opções terapêuticas.

Com a introdução da vancomicina, em 1958, surgiu uma alternativa no combate às infecções causadas pelo MRSA, utilizada ainda nos dias atuais. Porém, vários efeitos adversos relacionados ao uso de vancomicina têm sido relatados, sendo que o potencial ototóxico e nefrotóxico constituem os principais fatores limitantes para sua ampla utilização (Farber, Moelering, 1983).

A vancomicina apresenta atividade bactericida devido sua capacidade de bloquear a síntese do peptidoglicano, fundamental para a formação da parede celular bacteriana. A inibição da síntese do peptidoglicano ocorre devido a formação de um complexo entre a porção D-alanil-D-alanina do precursor da parede celular e a vancomicina (Chambers, Sande, 1996).

Em 1996, foi relatado no Japão o primeiro caso de infecção por *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária a vancomicina (*Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*, VISA) e em 1997 foi relatado o primeiro caso de cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA) (Wenzel, Edmont, 1998). Neste mesmo ano, foram relatados dois casos de infecções por VISA nos Estados Unidos (CDC, 1997). Nos anos subsequentes, o isolamento de cepas VRSA foi relatado nos Estados Unidos (CDC, 2002), França, Espanha, Reino Unido (Tenover, Biddle, Lancaster, 2001), Coreia e Japão (Song *et al.*, 2004), obtidas de pacientes que estavam fazendo uso prolongado de glicopeptídeos, principalmente

vancomicina, e que não estavam respondendo ao tratamento com o fármaco (Oliveira et al., 2001). Em 2000, foram isoladas quatro cepas VISA na ala de queimados e uma cepa na ala de ortopedia em hospital localizado na cidade de São Paulo. Estas cepas geneticamente parecidas evidenciam a disseminação entre pacientes. Este foi o primeiro relato de caso de isolamento desta linhagem de cepas na América Latina (Oliveira, 2002; Oliveira et al., 2001).

O mecanismo de resistência do *Staphylococcus aureus* à vancomicina ainda não está totalmente elucidado (McCulloch, 2006). Porém, acredita-se que seja pelo esgotamento da vancomicina do meio, causado pelo engrossamento da parede celular e conseqüente aumento do número de sítios de ligação D-alanil-D-alanina (Oliveira, 2002, Oliveira et al., 2001).

Ao longo das últimas quatro décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica, levou ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos com espectro de ação cada vez mais amplo (Norrby, Nord, Finch, 2005). Hoje é notório o uso inadequado destes medicamentos, porém não houve paralelamente a preocupação com as conseqüências futuras de tal desenvolvimento. A exposição a estes medicamentos pode desencadear resistência bacteriana, mesmo quando empregados de forma correta, sendo que o uso inadequado desses medicamentos agrava esta ocorrência, tornando o principal fator envolvido no surgimento de microrganismos multirresistentes, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos. Para prevenção deste quadro, assim como a disseminação destes microrganismos multirresistentes, é fundamental o estabelecimento de uma política de uso racional de antimicrobianos, além da busca de novos agentes quimioterápicos que sejam eficazes frente a estes microrganismos (Bush, 2004).

4.2. RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE

Os efeitos da maioria dos fármacos resultam de sua interação com componentes macromoleculares do organismo, denominados receptores ou

biorreceptores. Estas interações alteram a função do componente pertinente e, assim, dão início a mudanças bioquímicas e fisiológicas características da resposta ao fármaco. A afinidade de um fármaco por seu receptor e sua atividade intrínseca são determinadas por sua estrutura química. Esta relação é frequentemente muito específica. Assim, modificações relativamente pequenas na molécula do fármaco podem resultar em alterações importantes na resposta farmacológica (Barreiro, Fraga, 2001).

A maioria das interações fármaco-receptor é de caráter reversível, já que interações covalentes são irreversíveis e, portanto, indesejáveis na maioria dos casos, exceto para agentes alquilantes, alguns quimioterápicos e inibidores irreversíveis (Andrews, Tiltelolt, 1990). Do ponto de vista qualitativo, o grau de afinidade e a especificidade da ligação fármaco-receptor são determinados por interações intermoleculares, as quais compreendem forças eletrostáticas, de dispersão, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes, figura 2 (Andrews, Tiltelolt, 1990).

FIGURA 2: Receptor hipotético adrenérgico e as interações em regiões hidrofóbicas, íon-dipolo e de ligação de hidrogênio com epinefrina. (Adaptada de Carvalho *et al.*, 2003).

As variações em um fármaco, causadas por mudanças estruturais em sua molécula, podem ser correlacionadas com a afinidade relativa desses compostos bioativos por um mesmo receptor, ou seja, o grau de intensidade e afinidade da ligação de um composto, com ou sem determinado grupo funcional, reflete apenas os fatores associados a esse grupo (Andrews, Tiltelnoit, 1990). Desta forma, parâmetros que descrevem características estruturais e propriedades moleculares são usados para correlacionar, de modo quantitativo, variações na resposta biológica com mudanças na estrutura química, em série de compostos homólogos. São usadas propriedades físico-químicas que são diretamente relacionadas com as forças intermoleculares envolvidas na interação entre o composto e o receptor, e que igualmente descrevem as propriedades relacionadas ao transporte e à distribuição no sistema biológico (Andrews, Tiltelnoit, 1990). Para um melhor entendimento, estão relacionados na tabela 2, diferentes tipos de interações que podem ocorrer entre o fármaco e o receptor, bem como, as propriedades moleculares envolvidas e os correspondentes parâmetros descritores.

TABELA 2

Interações moleculares de um fármaco com seu receptor e correspondentes propriedades moleculares e parâmetros descritores envolvidos.

Interação fármaco-receptor	Propriedade molecular	Parâmetro descritor*
Hidrofóbica	Hidrofobicidade	$\log P, \pi, f$
Iônica, íon-dipolo, dipolo-dipolo, ligação de hidrogênio, transferência de carga	Efeito eletrônico	$\sigma, \sigma_m, \sigma_p, \mathcal{S}, \mathcal{R}, \nu, \delta^{13}$
Forças de London	Polarizabilidade	MR, MV
estereoquímica	Topologia	$E_s, r_V, (L, B_1, B_2, B_3 \text{ e } B_4)$

*: $\log P$: coeficiente partição; π : constante de grupo substituinte de Hansch; f : constante de fragmento de Rekker; $\sigma, \sigma_m, \sigma_p$: constante de grupo substituinte de Hammet; $\mathcal{S}, \mathcal{R}$: constantes de Swain e Lupton; ν , δ^{13} : parâmetros espectroscópicos; MR : refratividade molar; MV : volume molar; E_s : constante de Taft; r_V : raio de Van de Waals; L, B_1, B_2, B_3 e B_4 : parâmetros estéricos propostos por Verloop.

A seguir, será feita uma abordagem das propriedades físico-químicas, hidrofobicidade e efeito eletrônico, assim como dos principais parâmetros descritores envolvidos com estas propriedades.

4.2.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS QUE INFLUENCIAM A AÇÃO DE FÁRMACOS E PARÂMETROS RELACIONADOS

4.2.1.1. HIDROFOBICIDADE

Um fármaco precisa estar presente em concentrações adequadas nos seus locais de ação para produzir seus efeitos característicos. Embora seja evidente que depende diretamente da quantidade de fármaco administrado, as concentrações atingidas também dependem do grau e da taxa de sua absorção, ligação ao receptor ou localização dos tecidos, da sua biotransformação e da sua excreção (Hardman, Limbird, Gilman, 2001). A absorção, distribuição, biotransformação e excreção de um fármaco envolvem a passagem através de membranas celulares, sendo assim, este transporte é diretamente influenciado pelo tamanho e o formato do fármaco, sua solubilidade no local de absorção, o grau de ionização e a lipofilicidade das formas ionizadas e não-ionizadas (Tavares, 2004; Hardman, Limbird, Gilman, 2001).

O modelo mais aceito de membrana celular é o modelo do mosaico fluido, proposto por Singer e Nicolson (1972), figura 3, em que a estrutura é formada por uma dupla camada lipídica com extremidades hidrofóbicas voltadas para o interior e as hidrofílicas voltadas para o exterior. Participam da composição proteínas (integrals ou periféricas) e glicídios ligados às proteínas (glicoproteínas) ou lipídios (glicolipídios). Esta estrutura é permeável à água e soluções lipossolúveis, porém impermeáveis a íons e às moléculas polares não carregadas (glicídios) (Guyton, Hall, 1997).

FIGURA 3: Modelo de mosaico fluido da membrana.

A maior parte dos fármacos consiste em ácidos ou bases fracos, presentes em solução nas formas não ionizada e ionizada. De maneira geral, as moléculas não-ionizadas são mais lipossolúveis e podem difundir-se através da membrana celular por processo passivo, na dependência do gradiente de concentração do sistema e do coeficiente de partição da molécula, figura 4 (Tavares, 2004; Barreiro, Fraga, 2001). Por outro lado, as moléculas ionizadas geralmente não conseguem penetrar na membrana biológica por causa de sua baixa lipossolubilidade e por, normalmente, se encontrarem solvatadas por moléculas de água, dificultando o processo de absorção passiva (Barreiro, Fraga, 2001). Desta maneira, a absorção da forma ionizada, quando existente, ocorre por processo ativo e tem sua distribuição condicionada à sua constante de ionização e ao pH do meio (Tavares, 2004).

FIGURA 4: Grau de ionização e absorção passiva de ácidos ou bases fracas.
(adaptada de Barreiro, Fraga, 2001)

A hidrofobicidade regula o transporte e a distribuição do fármaco pelo sistema biológico, além de contribuir com as interações fármaco-receptor (Hansch, Leo, 1995; Kubinyi, 1993).

4.2.1.1.1 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

O valor do coeficiente de partição de uma determinada espécie química pode ser utilizado como parâmetro de hidrofobicidade em estudos que relacionam a atividade biológica com a estrutura da molécula, sendo definido como a razão entre as concentrações que se estabelecem, em condições de equilíbrio, de uma determinada espécie química, quando dissolvida em um sistema constituído por duas fases, sendo uma orgânica e outra aquosa, equação 1 (Tavares, 2004, Foye, Lemke, Williams, 1995; Kubinyi, 1993; Dearden, Bresnen, 1988).

$$P = C_{\text{org}} / C_{\text{aq}} \quad \text{ou} \quad \log P = \log C_{\text{org}} - \log C_{\text{aq}} \quad \text{equação 1}$$

Em que:

P = coeficiente de partição;

C_{org}= concentração de composto na fase orgânica em condições de equilíbrio;

C_{aq}= concentração de composto na fase aquosa em condições de equilíbrio.

De acordo com a equação 1, valores positivos de logP refletem uma preferência pela fase orgânica enquanto que valores negativos de logP refletem preferência pela fase aquosa.

Vários tipos de solventes são utilizados na determinação do coeficiente de partição, no entanto, o sistema *n*-octanol/tampão fosfato pH=7,4 é o solvente que tem demonstrado melhores condições para uso (Tavares, 2004; Kubinyi, 1993; Rekker, Mannhold, 1992). Entre as muitas vantagens deste sistema destacam-se as que se seguem: possui ampla capacidade de dissolução para diferentes compostos químicos uma vez que possui longa cadeia de carbono além do grupo hidroxila; não é volátil à temperatura ambiente; possui baixa absorção na região do U.V.; é quimicamente estável e disponível comercialmente; embora imiscível em água, tem capacidade de dissolver até 2,3 M de água, nas condições de equilíbrio e apresenta um grupo hidroxila que pode agir como doador e como receptor na formação de ligações de hidrogênio, assim, desta forma, as ligações de hidrogênio de uma molécula solvatada não precisam ser quebradas durante sua transferência da fase orgânica para a fase aquosa, fazendo com que se expresse apenas as interações hidrofóbicas (Tavares, 2004; Kubinyi, 1993; Rekker, Mannhold, 1992; Kubinyi, 1979).

Entre os diversos métodos de determinação do coeficiente de partição, o método denominado *shake-flask* (Tavares, 2004; Kubinyi, 1993; Hansch, Sammes, Taylor, 1990) é aplicado por ser um método direto. Este é, do ponto de vista técnico, um método relativamente simples, e se baseia na dissolução de um composto em um sistema bifásico, formado por um solvente polar e outro apolar. Este método é adequado, particularmente, para substâncias com

valores de coeficiente de partição na faixa compreendida entre 0,0 e 4,0 (Hansch, Sammes, Taylor, 1990; Dearden, 1988; Kubinyi, 1979), porém as substâncias devem estar puras para determinação confiável do respectivo coeficiente de partição (Tavares, 2004). Cromatografia em camada delgada, CCD, e cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE, têm sido alternativas na determinação do coeficiente de partição (Tavares, 2004). Estes métodos cromatográficos têm sido muito utilizados, pois apresentam algumas vantagens em relação ao método *shake-flask*. Dentre eles, citam-se a rapidez na execução dos ensaios e a precisão de determinação do coeficiente de partição de compostos que não apresentam alto grau de pureza ou que apresentem valores de logP muito elevados. Contudo, necessitam de padrões com coeficiente de partição em sistema n-octano/água conhecidos para a calibração do sistema cromatográfico (Tavares, 2004; Kubinyi, 1979)

4.2.1.1.2. PARÂMETRO π DE HANSCH-FUJITA

Hansch e Fujita (1964) definiram o parâmetro π , que representa a contribuição hidrofóbica de um determinado substituinte. Este parâmetro é definido como sendo a relação entre o logaritmo do coeficiente de partição de um composto substituído e o logaritmo do coeficiente de partição de seu análogo não-substituído, equação 2.

$$\pi_x = \log P_x - \log P_H \quad \text{equação 2}$$

Em que:

π_x = parâmetro que reflete a contribuição hidrofóbica do grupo substituinte X;

P_x = coeficiente de partição do composto substituído;

P_H = coeficiente de partição do composto não-substituído (quando X=H).

O parâmetro π de Hansch-Fujita tem sido bastante utilizado como medida da contribuição hidrofóbica de grupos substituintes, uma vez que mede a contribuição individual desses grupos para o coeficiente de partição de uma molécula (Tavares, 2004; Kubinyi, 1993; Hansch, Sammes, Taylor, 1990). A

posição do grupo substituinte influi significativamente no valor da constante de hidrofobicidade π (Tavares, 2004), sendo possível observar diferentes valores para um mesmo grupo substituinte em função de sua posição na molécula (Tavares, 2004; Kubinyi, 1993).

Por definição, valores positivos de π de Hansch são encontrados para grupos substituintes com caráter mais lipofílico, enquanto que valores negativos apresentam caráter mais hidrofílico (Hansch, Leo, Hoeckman, 1995; Hansch, Leo, 1995; Kubinyi, 1993; Hansch, Sammes, Taylor, 1990; Kubinyi, 1979).

4.2.1.2. EFEITO ELETRÔNICO

O efeito eletrônico, tanto indutivo quanto de ressonância, de um grupo substituinte é uma propriedade físico-química que descreve a influência deste grupo na distribuição eletrônica da molécula. As propriedades eletrônicas podem ser descritas por uma gama de diferentes parâmetros como, por exemplo, constante σ de Hammet (Hansch, Leo, Taft, 1991), parâmetros de campo S e ressonância R de Swain e Lupton (Swain, Lupton, 1968), valores de pK_a , entre outros. Os parâmetros eletrônicos normalmente se referem a determinados átomos ou grupos de átomos, e descrevem as interações de natureza polar que se estabelecem entre o fármaco e o receptor (Kubinyi, 1993).

4.2.1.2.1. PARÂMETRO σ DE HAMMET

A compreensão da natureza e grandeza dos efeitos eletrônicos de cada substituinte depende do entendimento dos conceitos de físico-química orgânica desenvolvidos por Hammet (1937). Hammet postulou que os efeitos eletrônicos de um conjunto de substituintes eram similares em reações orgânicas diferentes. Assim, os valores de efeito eletrônico de grupos substituintes determinados em uma reação orgânica padrão, poderiam ser utilizados para

estimar o comportamento de reações similares (Silverman, 2006; Hansch, Leo, Taft, 1991).

Hammett estudou a constante ionização de ácidos benzóicos, K_a , *para* ou *meta* substituídos, em água a 25 °C, figura 5.

FIGURA 5: Reação de ionização de ácidos benzóicos *para* ou *meta* substituídos

A seguir, foi verificada a relação logarítmica entre os valores de $\log K_X$ (logaritmo da constante de ionização para o correspondente ácido benzóico X -substituído) e de $\log K_H$ (logaritmo da constante de ionização para o correspondente ácido benzóico não-substituído). Dessa forma, foi definido o parâmetro eletrônico do substituinte, σ de Hammett, equação 3.

$$\sigma = \log K_X - \log K_H \quad \text{equação 3}$$

Em que:

σ = parâmetro que reflete a contribuição eletrônica do grupo substituinte X ;

K_X = constante de ionização do ácido benzóico X -substituído;

K_H = constante de ionização do ácido benzóico não-substituído (quando $X=H$).

As constantes σ são denominadas constantes de grupo, uma vez que caracterizam o comportamento eletrônico de um dado grupo substituinte. Os valores absolutos de σ refletem a grandeza do efeito eletrônico, sejam eles indutivos ou de ressonância, exercidos pelo substituinte sobre o centro de reação ou sobre a propriedade físico-química medida. Valores positivos de σ são observados para grupos substituintes aceptores de elétrons, enquanto que

valores negativos são observados em substituintes doadores de elétrons (Tavares, 2004; Hansch, Leo, 1995).

A partir dos valores de σ obtidos para diversos grupos substituintes, Hammet propôs uma relação linear de energia livre, conhecida por *equação de Hammet*. Esta equação correlaciona os valores de σ obtidos para os substituintes nas posições *para* e *meta* do anel benzênico sobre a posição de equilíbrio ou sobre a velocidade para o estabelecimento do equilíbrio, em reação de mesmo tipo para os compostos estudados, equação 4 (Tavares, 2004).

$$\log K_x = \rho\sigma + \log K_H \quad \text{equação 4}$$

Em que:

K_x = constante de equilíbrio ou de velocidade do composto substituído;

ρ = constante de reação;

σ = constante de grupo;

K_H = constante de equilíbrio ou de velocidade do composto não-substituído.

O valor do coeficiente angular da equação de Hammet corresponde a constante ρ , que é denominada de constante de reação. Sua grandeza mede a suscetibilidade da reação ou da propriedade medida ao efeito polar exercido pelo substituinte e depende da reação que a definiu. Valores positivos de ρ são observados em reações favorecidas por grupos que atraem elétrons e valores negativos, por grupos que repelem elétrons. O valor absoluto de ρ expressa a sensibilidade da reação ao efeito de grupos substituintes, ou seja, quanto maior o valor absoluto, maior é a suscetibilidade da reação ao efeito de grupo (Tavares, 2004, Hansch, Leo, 1995; Kubiniy, 1993; Hansch, Sammes, Taylor, 1990).

A constante de grupo proposta por Hammet seria uma medida do efeito polar de grupos substituintes sobre o centro de reação, caracterizado como a somatória dos efeitos de ressonância e indutivo, (Taft e Lewis, 1958), equações 5 e 6.

$$\sigma_p = \sigma_I + \sigma_R \quad \text{equação 5}$$

$$\sigma_m = \sigma_I + \alpha \sigma_R \quad \text{equação 6}$$

Em que:

σ_p e σ_m = valores da constante de σ Hammet para substituintes em posições *para* ou *meta* no anel benzênico, respectivamente;

σ_I e σ_R = contribuições dos efeitos indutivo e de ressonância respectivamente;

α = fator de correção para o efeito de ressonância a partir da posição *meta*.

A separação do parâmetro σ em seus componentes indutivo e de ressonância é importante por possibilitar a utilização da equação de Hammet expandida, equação 7, pela qual se torna possível a análise das contribuições relativas dos efeitos indutivos e de ressonância separadamente (Tavares, 2004).

$$\log K_x = \rho_I \sigma_I + \rho_R \sigma_R + \log K_H \quad \text{equação 7}$$

Em que:

K_x = constante de equilíbrio ou de velocidade do composto substituído;

ρ_I = constante de reação relacionada ao efeito indutivo;

σ_I = contribuição do efeito indutivo;

ρ_R = constante de reação relacionada ao efeito de ressonância;

σ_R = contribuição do efeito de ressonância;

K_H = constante de equilíbrio ou de velocidade do composto não-substituído.

4.2.1.2.2. CONSTANTES $\mathcal{F}$ E $\mathcal{R}$ DE SWAIN E LUPTON

Swain e Lupton (1968) propuseram o desmembramento do efeito eletrônico de grupos substituintes no efeito indutivo ou de campo ($\mathcal{F}$ - *field*), e no efeito de ressonância ($\mathcal{R}$ - *resonance*). Estes dois parâmetros foram considerados como combinações lineares e equivalentes ao valor da constante σ de hammet, equação 8.

$$\sigma = f\mathcal{J} + r\mathcal{R}$$

equação 8

Em que:

σ = constante de grupo;

$\mathcal{J}$ = efeito indutivo ou de campo;

$\mathcal{R}$ = efeito de ressonância;

f e r = coeficientes empíricos e independentes.

Parâmetros obtidos por técnicas espectrométricas, tais como frequência de absorção na região do infravermelho, ν , deslocamentos químicos de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C , δ , podem ser utilizados como parâmetros eletrônicos para descreverem o efeito eletrônico de grupos substituintes, principalmente em casos onde os valores das constantes de grupo σ não são tabelados ou, não adequados para o sistema em estudo (Tavares, 2004; Tavares, Amaral, 1997).

4.2.2. ESCOLHA DE GRUPOS SUBSTITUINTES

O método de seleção de grupos substituintes propostos por Craig (1971) permite que diferentes propriedades físico-químicas possam ser interrelacionadas, e posteriormente os dados obtidos, possam direcionar para o planejamento de novos análogos. Craig (1971) estudou as relações entre vários descritores estruturais e demonstrou que a constante de hidrofobicidade π , determinada por Hansch para sistemas benzênicos *para* ou *meta* substituídos (Hansch, Fujita 1964), é estatisticamente independente da constante σ , determinada por Hammet (Hammet, 1937).

A escolha dos grupos substituintes realizada pela influência dos efeitos eletrônicos (σ) e de hidrofobicidade (π), de acordo com o Diagrama de Craig, figura 6 (Craig, 1971), visando o estudo da atividade biológica deve ser realizada considerando a maior dispersão possível no diagrama, ou seja, os substituintes devem ser selecionados de forma a abranger os quatro quadrantes da distribuição cartesiana (Craig, 1971).

FIGURA 6: Diagrama de Craig (Craig, 1971).

Quando não se tem conhecimento sobre o comportamento da série a ser estudada, alguns grupos substituintes devem ser incluídos no estudo (Tavares, 2004; Kubinyi, 1993). Entre eles: grupo nitro (NO_2) – aceitor de elétrons; grupo amino (NH_2) – doador de elétrons com características polares; bromo e cloro (Br e Cl) – aceptores de elétrons de caráter lipofílico; grupo metila (CH_3) – doador de elétrons; hidrogênio (H) – considerado o composto de partida do diagrama.

4.3. MODIFICAÇÃO MOLECULAR

A descoberta de novos fármacos com estrutura química completamente nova é altamente dispendiosa, envolve vários anos de pesquisa e exige o esforço de equipes multi-disciplinares, sendo a otimização daqueles já existentes mais acessível técnica e financeiramente. Por outro lado, a modificação estrutural de compostos já existentes tem se mostrado como estratégia bastante promissora (Masunari, Tavares, 2007; 2006; Masunari, 2005; Silverman, 2004; Tavares, 2004; Barreiro, Fraga, 2001; Foye, Lemke, Willians, 1995). Diante disso, muitos pesquisadores têm voltado sua atenção para a otimização de fármacos com atividade biológica conhecida, alterando suas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas através do emprego de métodos de modificação molecular (Dias, 2005; Barreiro *et al.*, 2002).

A modificação molecular visa alterar problemas que podem limitar a utilização de um fármaco e/ou explorar esses efeitos indesejáveis a fim de se obter diferentes aplicações dos compostos estudados (Barreiro *et al.*, 2002; Chung, Ferreira, 1999; Korolkovas, 1988). Dentre as vantagens resultantes do emprego de técnicas de modificação molecular no desenvolvimento de novos fármacos, citam-se a possibilidade de obtenção de compostos com atividade superior e/ou menor toxicidade, a produção de novos fármacos com custo reduzido, similaridade com a síntese da molécula líder, além de que os resultados obtidos de atividade biológica podem ser associados aos parâmetros físico-químicos dos compostos, a fim de elucidar a relação entre estrutura química e a atividade biológica (Dias, 2005; Masunari, 2005; Tavares, 2004; Chung, Ferreira, 1999).

Diversas estratégias são conhecidas para a introdução de modificação molecular em um composto líder, com o objetivo de melhorar suas características farmacológicas (Silverman, 2004; Barreiro *et al.*, 2002; Barreiro, Fraga, 2001; Chung, Ferreira, 1999; Korolkovas, 1988). Dentre estas, a modificação molecular fundamentada no bioisosterismo tem permitido o planejamento e a identificação de novos análogos com melhor perfil terapêutico, resultado da otimização farmacológica do composto líder (Lima, Barreiro, 2005; Silverman, 2004; Barreiro, Fraga, 2001, Patani, La Voie, 1996; Burger, 1991).

O conceito de bioisosterismo está baseado em modificação que cause mudança em alguma característica físico-química ou estrutural do composto líder, sendo estritamente necessário que esta modificação mantenha o seu efeito biológico e, conseqüentemente, o reconhecimento do fármaco pelo receptor (Lima, Barreiro, 2005; Barreiro, Fraga, 2001; Patani, La Voie, 1996).

De maneira geral, o bioisótero, relativamente ao seu protótipo, pode variar o tamanho e forma da molécula. A forma molecular pode variar em função dos ângulos de ligação, e influenciar, por exemplo, a distribuição eletrônica com variação de cargas, efeitos eletrônicos, lipossolubilidade, hidrofobicidade, pKa, reatividade química, a capacidade de fazer ligações de

hidrogênio e variações nos fatores conformacionais, incluindo a capacidade de formar novas ligações de hidrogênio (intra- e intermolecular) nos bioisósteros diferentes do composto líder (Lima, Barreiro, 2005; Silverman, 2004; Barreiro, Fraga, 2001; Foye, Lemke, Willians, 1995).

O termo bioisosterismo surgiu da aplicação do princípio do isosterismo (Barreiro, Fraga, 2001, Patani, La Voie, 1996; Foye, Lemke, Willians, 1995), desenvolvido por Langmuir (1919), em moléculas bioativas, que defendia que átomos ou grupos de átomos com estrutura eletrônica e propriedades físico-químicas similares apresentavam o mesmo comportamento no sistema biológico. Nessa definição foram consideradas as moléculas que continham o mesmo número de átomos, a mesma disposição e número de elétrons e as mesmas características físico-químicas (Patani, La Voie, 1996).

Em 1951, Friedman introduziu o termo bioisosterismo para descrever o fenômeno observado entre substâncias estruturalmente relacionadas que apresentavam propriedades biológicas similares ou antagônicas (Friedman, 1951). Em 1970, Burger classificou e subdividiu os bioisósteros em duas grandes classes (Burger, 1970), sendo elas formadas pelos bioisósteros clássicos e não clássicos, tabela 3.

TABELA 3
Bioisósteros clássicos e bioisósteros não-clássicos

Bioisósteros clássicos						
Monovalentes	Divalentes	Trivalentes	Tetravalentes	Anéis		
F, OH, NH ₂ , CH ₃ , OR, Cl, SH, PH, Br, I	-CH ₂ - -O- -S- -Se- -Te	=CH- =N- =P- =As-	=C= =Si= =N ⁺ = =P ⁺ =
Bioisósteros não-clássicos						
-CO-	-COOH	-SO ₂ NH ₂	-H	-CONH-	-COOR-	-CONH ₂
-CO ₂ -	-SO ₃ H	-PO(OH)NH ₂	-F	-NHCO-	-ROCO-	-CSNH ₂
-SO-	tetrazol					
-SO ₂ NR-	-SO ₂ NHR		-OH		Catecol	
-CON-			-CH ₂ OH		-benzinidazol	
-CH(CN)-		-NHCONH ₂				
R-S-R'	=N-	-NH-CS-NH ₂				-C ₅ H ₄ N
R-N(CN)-	-C(CN)=					-C ₄ H ₄ N
R'	-halogênio					
	-CF ₃					
	-CN					

Fonte: Barreiro, Fraga, 2001.

O emprego adequado do bioisosterismo exige que os parâmetros físico-químicos sejam cuidadosamente analisados, de maneira a se antecipar as eventuais alterações em termos de propriedades físico-químicas que o bioisostéro irá apresentar (Lima, Barreiro, 2005; Silverman, 2004; Barreiro, Fraga, 2001; Foye, Lemke, Willians, 1995).

Algumas modificações alteram drasticamente as propriedades físico-químicas das substâncias, tanto quanto sua atividade biológica, como por exemplo, a substituição de um grupamento -OH por um -NH₂ em um composto aromático, figura 7. Neste exemplo de substituição clássica a

alteração causada no pKa resulta em mudanças no perfil farmacocinético dos bioisósteros. Desta forma, é possível prever alterações na hidrofobicidade e na reatividade química (Barreiro, Fraga, 2001).

FIGURA 7: Bioisosterismo clássico monovalente

Portanto, embora grupamentos envolvidos possam ser considerados bioisostéricos, a atividade relativa dos compostos se modifica drasticamente (Barreiro, Fraga, 2001). Desta forma, a modificação molecular realizada com êxito em uma série de análogos não terá necessariamente os mesmos resultados promissores para outra série em estudos.

4.4. NIFUROXAZIDA

A nifuroxazida é um fármaco pertencente à classe dos nitrofuranos. O primeiro composto desta classe a ser introduzido em terapêutica foi a nitrofurazona, nos anos 40 (Dodd, Stilman, 1944). Desde então, centenas de compostos derivados do 5-nitrofurano foram sintetizados e avaliados quanto a atividade antimicrobiana e demonstraram amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e também sobre alguns protozoários (Korolkovas, França, 2005; Hardman, Limbird, Gilman, 2001, Tavares *et al.*, 1999; Leonard, Andremont, Tancrede, 1985; Avril *et al.*, 1980). Ressalta-se, entretanto, que apenas alguns destes compostos são utilizados na prática médica, devido ao fato de apresentarem alta toxicidade (Korolkovas, França, 2005; Aguirre *et al.*, 2005, Cerecetto *et al.*, 1998). Nas décadas de 80 e

90 pouca importância foi dada a essa classe de compostos, no entanto mais recentemente, novo interesse tem se voltado para esses compostos, visando, principalmente, a identificação de análogos terapeuticamente promissores. Apresentam-se, na tabela 4, alguns compostos 5-nitrofurânicos utilizados atualmente como fármacos (Korolkovas, França, 2005; Aguirre *et al.*, 2005a, 2005b; Hardman, Limbird, Gilman, 2001).

Os compostos descritos na tabela 4 apresentam em comum o grupo azometínico ($-\text{CH}=\text{N}-\text{N}<$) ligado ao carbono 2 do anel heterocíclico. O grupo azometínico apresenta propriedade antimicrobiana intrínseca, o que resulta em um sinergismo farmacológico entre este grupo e o sistema 5-nitrofurano (Foye, Lemke, Willians, 1995). A conjugação entre estas duas subestruturas, figura 8, constitui o grupo farmacofórico responsável pela atividade antimicrobiana dos compostos nitrofurânicos.

FIGURA 8: Grupo farmacofórico de compostos nitrofurânicos com atividade antimicrobiana.

TABELA 4
Compostos nitrofurânicos utilizados atualmente na farmacoterapia humana

Composto	Características gerais
<p style="text-align: center;">Nitrofurazona</p>	<p>Usado como bactericida. Atua sobre bactérias Gram-positivas presentes em infecções superficiais. Usado em tratamento de queimaduras de segundo e terceiro graus.</p> <p>É tóxico quando administrado por via oral, causando hemólise e neuropatia periférica grave. Foi retirado do comércio em alguns países e, em outros como no Brasil, seu uso é permitido apenas por via tópica.</p>
<p style="text-align: center;">Nitrofurantoína</p>	<p>Usado como bactericida em concentrações terapêuticas que são atingidas apenas na urina. Usado em infecções urinárias. Apresenta a vantagem de raramente provocar resistência bacteriana durante tratamento prolongado com este fármaco</p>
<p style="text-align: center;">Furazolidona</p>	<p>Usado em infecções intestinais causadas por <i>Giardia lamblia</i>, porém não é o fármaco de 1ª escolha. Pode ser usado no tratamento de enterites e disenterias causadas por bactérias sensíveis (<i>Salmonella</i>, <i>Shigella</i>, <i>V. cholerae</i>).</p>
<p style="text-align: center;">Nifurtimox</p>	<p>Usado no tratamento da Doença de Chagas. Ineficiente no tratamento da fase crônica da doença. Dentre os efeitos tóxicos atribuídos a este fármaco citam-se anorexia, distúrbios psíquicos e comportamentais. Este fármaco não é comercializado no Brasil, porém ainda é utilizado em outros países da América Latina.</p>

Fontes: Korolkovas, França, 2005; Aguirre *et al.*, 2005a, 2005b; Hardman, Limbird, Gilman, 2001.

O mecanismo de ação antimicrobiana de compostos nitrofurânicos é dependente da redução *in vivo* do grupo nitro com geração de radicais livres tóxicos aos microrganismos (Viodé *et al.*, 1999; Squella, *et al.*, 1995). Estudos realizados por Viodé e colaboradores (Viodé *et al.*, 1999), sugerem duas rotas possíveis, figura 9, para bioativação de compostos nitrofurânicos.

FIGURA 9: Esquema da via bio-redutiva de compostos nitro-heterocíclicos (adaptada de Viodé *et al.*, 1999).

Na rota anaeróbica, o processo de redução do grupo nitro proporciona acúmulo de radical nitroânion gerado na primeira etapa. Este radical é posteriormente transformado em seu derivado nitroso correspondente. Na etapa final desta rota, ocorre redução do derivado nitroso e formação de derivado amino. Em condições aeróbicas, o radical nitroânion gerado na primeira etapa reage com oxigênio gerando ânion superóxido, o qual é posteriormente transformado em peróxido de hidrogênio pela reação com a superóxido dismutase (S.O.D.). O acúmulo de peróxido de hidrogênio ocasiona a formação de hidroxila radicalar, que é uma espécie altamente prejudicial as células, pois reage com macromoléculas endógenas resultando em danos biológicos, como lesão de membrana, inativação enzimática e mutagênese (Viodé *et al.*, 1999).

Estudos sobre o comportamento de alguns compostos 5-nitrofurânicos (Avril *et al.*, 1980), determinaram que a administração oral da nifuroxazida,

figura 10, 5-nitro-2-furfurilideno 4-hidroxibenzidrazida, não condicionava o desenvolvimento de mecanismos de resistência microbiana causada por transferência de plasmídios.

FIGURA 10: Estrutura química da nifuroxazida

A nifuroxazida apresenta características estruturais que propiciam o emprego de métodos de modificação molecular planejada, tornando este fármaco um composto líder para a identificação de novos análogos.

Em estudos realizados por Tavares (Tavares *et al.* 1999; Tavares, Penna, Amaral, 1997; Tavares, 1993; Tavares, Vesssoni-Penna, Amaral, 1997) observou-se que a substituição da hidroxila fenólica da nifuroxazida por grupos aceptores de elétrons favorece a atividade antibacteriana frente às cepas de *Staphylococcus aureus*. Além disso, observou-se também que a hidrofobicidade é a propriedade físico-química de maior influência na atividade antimicrobiana dos compostos desta série (Tavares, Vessoni-Penna, Amaral, 1991).

A substituição do anel 5-nitrofurfânico pelo anel 5-nitrotiofênico favorece significativamente a atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus* de séries análogas à nifuroxazida (Masunari, Tavares, 2007; 2006; Rezende, 2002). Estudos comparativos entre estas duas séries (Tavares *et al.*, 1999) demonstraram que o derivado 5-nitro-2-tiofilideno 4-acetilbenzidrazida apresentou um valor de concentração inibitória mínima (CIM= 0,16 µg/mL) sendo quatro vezes menor quando comparado com o derivado 5-nitro-2-furfurilideno 4-acetilbenzidrazida (CIM= 0,60 µg/mL), e ambos, com potência superior à nifuroxazida (CIM= 3,60 µg/mL). Além disso, vários análogos se mostraram ativos frente a cepas multirresistentes de

Staphylococcus aureus (Masunari, Tavares, 2007; 2006; Masunari, 2005; Rezende, 2002).

Em outros estudos (Dias, 2005; Furlanetto, 2005) demonstrou-se que derivados 5-nitrotiofênicos, análogos à nifuroxazida, apresentam atividade frente ao *Trypanossoma cruzi*, agente causal da Doença de Chagas, sendo alguns análogos mais ativos que o benznidazol, único fármaco disponível no Brasil para o tratamento desta doença.

Desta forma, fica evidenciado o forte potencial da nifuroxazida como composto líder para o desenvolvimento de novos análogos, buscando assim, identificar compostos que sejam mais ativos e/ou menos tóxicos e, com potencial de aplicação como fármacos antimicrobianos.

Plano de Trabalho

Para este trabalho, foram planejados onze compostos, sendo quatro derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos (série I) e sete derivados 5(6)-benzofuroxânicos (série II), figura 11, com estruturas análogas à nifuroxazida.

FIGURA 11: Estrutura química da nifuroxazida (A). Em destaque, os locais de modificação estrutural planejados neste estudo. (B) derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos e (C) derivados 5(6)-benzofuroxânicos.

A troca do anel furânico pelo anel tiofênico neste trabalho, figura 11B, foi fundamentada no conceito de bioisosterismo clássico de anéis (Barreiro, Lima, 2005; Barreiro, Fraga, 2001; Patani, La Voie, 1996). Estudos realizados em nosso grupo (Masunari, Tavares, 2007; 2006; Rezende 2002, Tavares *et al.*, 1999), demonstraram que a substituição do anel furânico da nifuroxazida pelo anel tiofênico favoreceu significativamente a atividade antimicrobiana. Com isso, e buscando obter análogos menos tóxicos optou-se também neste trabalho, por introduzir no anel tiofênico o grupo metilsulfonila, baseado em sua semelhança eletrônica com o grupo nitro, além de sua capacidade de sofrer

bioedução, o que, considerando o mecanismo de ação dos nitrocompostos, supostamente, manteria a bioatividade destes análogos.

A troca do sistema nitrofurânico por benzofuroxânico, figura 11C, foi fundamentada na semelhança de atividade atribuída ao sistema 5-nitrofurânico (Aguirre *et al.*, 2005a; 2005b; Cerecetto *et al.*, 1999), ou seja, acredita-se que a redução do *N*-óxido seja capaz de gerar espécies radicalares, e assim permitir o desenvolvimento da atividade antimicrobiana.

Assim e com o propósito de se identificar novos análogos ativos frente a *Staphylococcus aureus* e principalmente buscando menor toxicidade comparativamente ao composto de partida, realizou-se neste estudo a modificação na estrutura química da nifuroxazida, figura 11. O planejamento de substituição da hidroxila fenólica por diversos grupos substituintes foi fundamentado no Diagrama de Craig (1971) e avaliou-se seus efeitos na atividade antimicrobiana destes compostos, buscando, desta forma, identificar análogos com melhor perfil farmacológico.

Os compostos foram preparados em três etapas, a saber: síntese de benzoatos de metila a partir de ácidos benzóicos substituídos; síntese de benzidrazidas substituídas a partir dos benzoatos de metila e síntese de Bases de Schiff a partir de benzidrazidas substituídas com 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído, para obtenção da série I, e 5-formilbenzofuroxano, para obtenção da série II.

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos planejados, propôs-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) frente à cepa padrão (ATCC25923) de *Staphylococcus aureus* e os compostos que apresentaram maior atividade frente a este microrganismo foram também avaliados frente às cepas multirresistentes (VISA3 e 3SP/R33) (Oliveira, 2002; Oliveira, 1998).

Materiais e Métodos

6.1. MATERIAIS

6.1.1. REAGENTES E SOLVENTES

- Ácidos benzóicos substituídos 99% - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- Hidrato de hidrazina 64% disponível no Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos do FBT/FCF/USP;
- 5-bromo-2-tiofenocarboxaldeído 95% - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- Metanosulfinato de sódio 85% - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- 4-cloro-3-nitrobenzaldeído 98% - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- Azida de sódio - Fluka and Riedel-de Haën Company;
- Ácido acético - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- Álcool etílico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- Álcool metílico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- Ácido sulfúrico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- Clorofórmio PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- Dimetilsulfóxido PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- Dimetilsulfóxido-d₆ 99,5% - Cambridge Isotope Laboratories, Inc.;
- *N,N*-dimetilformamida PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- Éter etílico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- Éter de petróleo (30 – 70) PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;
- Tolueno - Nuclear;
- Brometo de potássio grau espectroscópico - Aldrich Chemical Company, Inc.;
- Pentóxido de fósforo - Fluka and Riedel-de Haën Company.

6.1.2. EQUIPAMENTOS

- Aparelho digital de ponto de fusão Micro-química modelo MQAPF-301;
- Autoclave Tuttnauer Brinkmann 3870E;
- Balança analítica digital Ohaus;
- Balança digital Marte;

- Elementar Analyser 24013 CHN, Perkin-Elmer;
- Espectrofotômetro de Infravermelho Shimadzu IR-470;
- Espectrômetro Bruker, modelo Advance DPX-300 Mhz;
- Rotaevaporador Fisatom.

6.1.3. MICRORGANISMOS E MEIOS DE CULTURA

- Microrganismos: *Staphylococcus aureus*, cepa ATCC25923;
Staphylococcus aureus, cepa 3SP/R33*, isolada de pacientes hospitalizados no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – SP (Oliveira *et al.*, 2001, Oliveira, 1998);
Staphylococcus aureus, cepa VISA3*, cepa isolada de biopsia de queimadura de pacientes hospitalizados no Hospital Geral Vila Penteado em São Paulo – SP (Oliveira, 2002).
- PCA (*Plate Count Agar*), Fluka and Riedel-de Haën Company: ágar desidratado para métodos padronizados, dissolvido e esterilizado segundo especificações do rótulo;
- TSB (*Tryptic Soy Broth*), Merck: meio de cultura, dissolvido e esterilizado segundo especificações do rótulo;
- Solução fisiológica esterilizada (cloreto de sódio 0,85%).

6.2. MÉTODOS

Foram planejadas neste trabalho as preparações de duas séries de compostos, a saber:

Série I: 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas substituídas;

Série II: 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas substituídas.

* Cepas gentilmente disponibilizadas pelo Laboratório de Referência Nacional em Fagotipagem de *Staphylococcus aureus* (LRNFL) do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob coordenação da Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka.

Apresentam-se, a seguir, os métodos de preparação das benzidrazidas substituídas, comuns às duas séries, utilizadas como intermediários para obtenção dos compostos planejados.

6.2.1.1. OBTENÇÃO DE BENZOATOS DE METILA (Tavares, 1993)

FIGURA 12: Esterificação dos ácidos benzóicos substituídos.

Os ácidos benzóicos (I) foram dissolvidos em metanol anidro em excesso (1:50). Adicionou-se pequeno volume de ácido sulfúrico para agir como catalisador. Este sistema foi mantido sob refluxo por quatro horas. Por rotaevaporação, reduziu-se o volume de metanol, obtendo-se o éster desejado (II) por resfriamento, que foi posteriormente filtrado, lavado com água destilada e seco em presença de pentóxido de fósforo.

6.2.1.2. OBTENÇÃO DE BENZIDRAZIDAS *para*-SUBSTITUÍDAS (Tavares, 1993)

FIGURA 13: Reação de amonólise de ésteres substituídos

Hidrato de hidrazina 64% foi aquecida até 50-60 °C sob agitação magnética e em seguida o benzoato de metila (II) foi adicionado em pequenas porções. A temperatura foi elevada até atingir refluxo e mantido sob essa

condição por dez minutos. Em seguida, resfriou-se o sistema em banhos sucessivos de água, gelo e gelo seco com etanol para cristalizar o produto desejado. A benzidrazida precipitada foi filtrada e seca em presença de pentóxido de fósforo.

6.2.2. OBTENÇÃO DA SÉRIE I

Os derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos foram obtidos em duas etapas, a saber:

- preparação do aldeído 5-metilsulfonil-2-tiofeno carboxaldeído;
- preparação de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas substituídas a partir de benzidrazidas substituídas e 5-metilsulfonil-2-tiofeno carboxaldeído.

6.2.2.1. OBTENÇÃO DE 5-METILSULFONIL-2-CARBOXALDEÍDO (Kada, Knoppova, Kovac, 1980)

FIGURA 14: Reação de obtenção do 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído a partir de 5-bromo-2-tiofenocarboxaldeído

Metanosulfonato de sódio e 5-bromo-2-tiofenocarboxaldeído foram adicionados em *N,N*-dimetilformamida e esta mistura foi aquecida até 130-140°C e mantida sob agitação magnética por um período de quatro horas. Após este período, o sistema foi resfriado e adicionou-se água destilada, seguido de extrações com clorofórmio. Adicionou-se sulfato de magnésio

anidro. O sistema foi filtrado e evaporou-se o clorofórmio até obtenção de um óleo. A cristalização foi feita com etanol/água. O aldeído obtido (IV) foi filtrado, lavado com água destilada e seco em presença de pentóxido de fósforo.

6.2.2.2. OBTENÇÃO DE DERIVADOS 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDÊNICOS

FIGURA 15: Reação de obtenção das 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas substituídas

Adicionou-se 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído (IV) sobre mistura de água, ácido sulfúrico, ácido acético e metanol (8:7:8:20 v/v) (Tavares, 1993). Aqueceu-se o meio reacional até temperatura de refluxo, adicionando-se lentamente, sob agitação magnética constante, a benzidrazida substituída (III). Observou-se a formação de sólido amorfo (V), que depois de filtrado, foi lavado com água destilada e recristalizado em dimetilformamida/água.

6.2.3. OBTENÇÃO DA SÉRIE II

Os derivados 5(6)-benzofuroxânicos foram obtidos em três etapas, a saber:

- preparação do aldeído 4-azido-3-nitrobenzaldeído;
- preparação de 5-formilbenzofuroxano;
- preparação de 5(6)-benzofuroxano benzidrazidas substituídas a partir de benzidrazidas substituídas e 5-formilbenzofuroxano.

6.2.3.1. OBTENÇÃO DE 4-AZIDO-3-NITROBENZALDEÍDO (Ghosh, Whitehouse, 1968)

4-cloro-3-nitrobenzaldeído e azida de sódio foram adicionados em dimetilsulfóxido. Esta mistura foi aquecida até 75 °C e mantida sob agitação magnética por trinta minutos. Após este período, o sistema foi resfriado e adicionou-se água destilada, seguido de extrações com éter etílico. Adicionou-se sulfato de magnésio anidro. O sistema foi filtrado e evaporou-se o éter até obtenção de um óleo. A cristalização foi feita de etanol/água. O aldeído obtido (VI) foi filtrado, lavado com água destilada e seco em presença de pentóxido de fósforo.

FIGURA 16: Obtenção de 4-azido-3-nitrobenzaldeído

6.2.3.2. OBTENÇÃO DE 5-FORMILBENZOFUROXANO (Ghosh, Whitehouse, 1968)

4-azido-3-nitrobenzaldeído (VI) foi colocado sob refluxo em tolueno por trinta minutos. O tolueno foi evaporado e o óleo obtido redissolvido em acetato de etila. Adicionou-se éter de petróleo e a solução foi resfriada. A cristalização foi feita de etanol/água. O aldeído obtido (VII) foi filtrado, lavado com água destilada e seco em presença de pentóxido de fósforo.

FIGURA 17: Reação de ciclocondensação de 4-azido-3-nitrobenzaldeído até formação do 5-formilbenzofuroxano

6.2.3.3. OBTENÇÃO DE DERIVADOS 5(6)-BENZOFUROXÂNICOS

Adicionou-se 5-formilbenzofuroxano (VII) sobre mistura de água, ácido sulfúrico, ácido acético e metanol (8:7:8:20 v/v) (Tavares, 1993). Aqueceu-se o meio reacional até temperatura de refluxo, adicionando-se lentamente, sob agitação magnética constante, a benzidrazida substituída (III). Observou-se a formação de sólido amorfo (VIII), que depois de filtrado foi lavado com água destilada e recristalizado em dimetilformamida/água.

FIGURA 18: Reação de obtenção de 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas substituídas

6.2.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A estrutura química dos compostos sintetizados foi comprovada utilizando-se análise espectrométrica de absorção na região no Infravermelho

(IV), espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H) e de carbono (RMN- ^{13}C). A determinação da faixa de fusão foi utilizada como critério de pureza dos compostos obtidos.

6.2.4.1. FAIXA DE FUSÃO

As faixas de fusão dos compostos obtidos foram realizadas em lâminulas de vidro, utilizando-se aparelho digital de marca Micro-química modelo MQAPF-301.

6.2.4.2. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os espectros no IV foram realizados em espectrofotômetro Shimadzu IR-470, utilizando-se dispersão em brometo de potássio.

6.2.4.3. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

Os espectros de RMN foram realizados em espectrômetro Bruker, modelo Advance DPX-300 Mhz, no *Laboratório de Análise Instrumental/FCF/USP*. Utilizou-se dimetilsulfóxido- d_6 como solvente e tetrametilsilano como padrão de referência interna.

6.2.4.4. ANÁLISE ELEMENTAR

A análise elementar do aldeído 5-formilbenzofuroxano foi realizado em analisador CHN modelo Elementar Analyser 24013 CHN, Perkin-Elmer, na *Central Analítica/IQ/USP*.

6.2.5. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

A determinação da concentração inibitória mínima, CIM, dos compostos sintetizados frente à *Staphylococcus aureus* (cepas ATCC25923, 3SP/R33, VISA3) envolveu duas fases. Na primeira fase foi determinada, de forma quantitativa, a atividade antimicrobiana utilizando-se o método clássico de macrodiluição sucessiva (CLSI, 2006; Collins, 1995). Na segunda fase foi utilizada metodologia adaptada por Tavares e colaboradores (Tavares *et al.*, 1999; Tavares, Penna, Amaral, 1997, Tavares, 1993) com o propósito de se intensificar a sensibilidade do ensaio. Apresenta-se a seguir, os procedimentos adotados para realização dos ensaios.

6.2.5.1. PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados nos ensaios, ágar PCA e caldo nutritivo TSB, foram preparados de acordo com as especificações do rótulo e esterilizados em autoclave a 121 °C por trinta minutos.

6.2.5.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES-MÃE DE COMPOSTOS A SEREM TESTADOS

Cada composto a ser testado, foi diluído em 10,0 mL de DMSO, a fim de originar solução com concentração equivalente a 800 µg/mL. Foram transferidos 2,0 mL desta solução para frasco contendo 8,0 mL de TSB de forma a originar solução de concentração equivalente a 160 µg/mL, posteriormente empregada na execução dos ensaios. Devido à baixa solubilidade dos compostos 5(6)benzofuroxano 4-nitrobenzidrazida e 5(6)-benzofuroxano 4-metilbenzidrazida, apresentada no meio de cultura TSB, optou-se em preparar uma solução-mãe de concentração equivalente a 600 µg/mL.

6.2.5.3. PREPARO DO INÓCULO

6.2.5.3.1. PREPARO DO INÓCULO DA CEPA ATCC25923

As culturas de *Staphylococcus aureus* foram cultivadas em três tubos de ensaio contendo PCA inclinado e incubadas a 35 °C por 24 horas. Procedeu-se a lavagem das colônias utilizando-se para cada tubo 5,0 mL de solução fisiológica previamente esterilizada. As suspensões foram transferidas para frasco contendo pérolas de vidro e barra magnética, seguido de agitação constante por 30 minutos, a fim de obter a homogeneização do meio. Transferiu-se 1,0 mL desta suspensão para frasco contendo 99,0 mL de solução fisiológica, pérolas de vidro e barra magnética, seguido de agitação constante por 15 minutos, gerando suspensão com concentração de microrganismos de $1,0 \times 10^{-2}$ em relação a suspensão inicial. Este mesmo procedimento foi repetido para gerar a suspensão de concentração $1,0 \times 10^{-4}$. Para obter o inóculo final, foi transferido 1,0 mL da suspensão anterior, para frasco contendo 99,0 mL TSB, pérolas de vidro e barra magnética e mantido sob agitação por 15 minutos, gerando suspensão de 10^4 unidades formadoras de colônia/mL, posteriormente utilizada nos ensaios.

6.2.5.3.2. PREPARO DO INÓCULO DAS CEPAS 3SP/R33 E VISA3

As cepas multirresistentes, estocadas em glicerol e mantidas congeladas foram diluídas em meio de cultura TSB na proporção de 1:200 (v/v). Esta suspensão foi incubada à 35 °C por 20 horas, sendo que após este período, obtém-se suspensão com turbidez equivalente a solução padrão 0,5 na escala de McFarland (CLSI, 2006). Esta suspensão apresenta concentração de aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL. Transferiu-se 1,0 mL desta suspensão para frasco contendo 99,0 mL de solução fisiológica, pérolas de vidro e barra magnética, seguido de agitação constante por 15 minutos, gerando suspensão com concentração de microrganismos de $1,0 \times 10^{-2}$ em relação a suspensão inicial. Para obter o inóculo final, foi transferido 1,0 mL da suspensão anterior, para frasco contendo 99,0 mL TSB, pérolas de vidro e barra magnética e

mantido sob agitação por 15 minutos, gerando suspensão de 10^4 UFC/mL, posteriormente utilizada nos ensaios.

6.2.5.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA, CIM

A CIM dos compostos foi determinada por método de macrodiluição em tubos. Apresenta-se, na figura 19, o procedimento geral para realização dos ensaios biológicos.

FIGURA 19: Procedimento geral adotado na determinação da CIM.

FASE I

Numera-se de 1 a 12 três séries de tubos de ensaio previamente esterilizados. Procede-se a transferência de 1,0 mL de TSB, para cada tubo de ensaio, com exceção do tubo 1. Transfere-se 1,0 mL da solução-mãe para os tubos 1 e 2 de cada série. A solução contida no tubo 2 é homogeneizada, transferindo-se em seguida, 1,0 mL desta solução para o tubo 3, e assim sucessivamente até o tubo 11. Adiciona-se 1,0 mL de inóculo em todos os

tubos, com exceção do tubo 11. Procede-se homogeneização de todos os tubos, incubando-os a 35 °C.

Leituras de inibição/crescimento microbiano são executadas após 18, 24 e 48 horas observando-se, a cada leitura, o controle de esterilidade da solução teste, tubo 11, e o controle microbiano, tubo 12. A leitura realizada com 18 horas de incubação à 35 °C é considerada como resultado de interesse. As leituras realizadas com 24 e 48 horas são utilizadas como simples confirmação de resultados e controle de esterilidade do tubo 11.

FASE II

Para a realização da fase II, utiliza-se metodologia desenvolvida por Tavares e colaboradores (Tavares *et al.*, 1999; Tavares, Penna, Amaral, 1997, Tavares, 1993) a fim de intensificar a sensibilidade do método.

Parte-se inicialmente da solução com concentração equivalente a 800 µg/mL (ou 600µg/mL para os derivados 4-NO₂ e 4-OH substituídos) do composto em DMSO. São realizadas diluições sucessivas em meio de cultura TSB a fim de obter solução com concentração final equivalente a duas vezes a CIM determinada na fase I.

Utiliza-se nesta fase, cinco séries de oito tubos, estando estes devidamente esterilizados e numerados. Trabalha-se, nesse caso, com concentrações intermediárias situadas na faixa de CIM obtida na fase I, ou seja, o tubo 1 deve apresentar concentração equivalente à CIM determinada na fase I e o tubo 6 deve apresentar concentração imediatamente anterior à CIM obtida na fase I. Nessa segunda etapa, os tubos 7 e 8 corresponderam aos controles de esterilidade e crescimento microbiano, respectivamente. Após o preparo das diluições correspondentes à cada tubo, estes são homogeneizados e incubados à 35 °C. As leituras de inibição/crescimento microbiano foram realizadas após 18, 24 e 48 horas.

Resultados

7.1. SÍNTESE E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Neste trabalho foram sintetizados e identificados, quatro derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos (série I), e sete derivados 5(6)-benzofuroxânicos (série II). Salienta-se que estes onze compostos apresentam estruturas químicas inéditas. A síntese total das duas séries foi realizada em três etapas. Na primeira etapa obtiveram-se os benzoatos de metila a partir de seus correspondentes ácidos benzóicos. Na segunda etapa, obtiveram-se as benzidrazidas substituídas a partir de seus correspondentes benzoatos de metila. Cita-se que alguns intermediários utilizados neste estudo, foram previamente sintetizados e identificados pelo grupo de pesquisa do *Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos – FBT/FCF – USP* sob coordenação do Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares (Masunari, Tavares, 2007; 2006; Rezende, 2002) e foram gentilmente cedidos pelos autores para utilização neste estudo. A etapa final envolveu a preparação das Bases de Schiff pela reação das benzidrazidas substituídas com 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído para obtenção da série I, e com 5-formilbenzofuroxano para obtenção da série II.

A identificação dos benzoatos de metila substituídos e suas respectivas benzidrazidas foi realizada mediante comparação da faixa de fusão experimental com a descrita em literatura. A identificação dos compostos finais foi realizada por análise espectrométrica de IV, RMN - ^1H e RMN - ^{13}C (Silverstein, Basler, Morril, 2005). O grau de pureza dos compostos foi avaliado por determinação de faixa de fusão. A seguir, apresenta-se nas tabelas 5 a 8 o resultado referente à síntese dos intermediários e dos produtos finais. O procedimento detalhado da síntese total das duas séries encontra-se descrito no *Anexo 1, "Procedimento experimental para preparação das séries I e II"*.

7.1.1. SÍNTESE DOS DERIVADOS 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDÊNICOS (série I)

Nas tabelas 5, 6 e 7, apresentam-se os dados referentes a cada etapa de síntese envolvida no preparo das 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas

substituídas. Ressalta-se que os dados referentes à obtenção dos benzoatos de metila e suas respectivas benzidrazidas, tabelas 5 e 6, são comuns as duas séries.

TABELA 5
Síntese de benzoatos de metila *para-R*-substituídos

Composto (R)	Material de partida ^a g - (mol)	Volume dos reagentes (mL)		Rendimento (η %)		Faixa de fusão (°C)	
		CH ₃ OH	H ₂ SO ₄	Exp.	Lit. ^b	Exp.	Lit. ^c
Br	2,50 (0,012)	25,0	0,50	87	78	76,7-78,3	78-79
Cl	2,50 (0,016)	25,0	0,50	82	95	39,5-40,8	42-44
COCH ₃	2,00 (0,01)	25,0	0,50	75	92	86,4-90,4	89,0-91,0

a: ácido benzóico para-substituído

b: Tavares, 1993

c: Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie

TABELA 6
Síntese de benzidrazidas *para-R*-substituídas

Composto (R)	Material de partida ^a g – (mol)	Volume N ₂ H ₄ 64% (mL)	Rendimento (η %)		Faixa de fusão (°C)	
			Exp.	Lit. ^b	Exp.	Lit. ^c
H ^d	--	--	--	--	109,9-111,4	113-117
Br	1,00 (0,005)	15,0	69	85	166,0-167-9	165-167
Cl	1,00 (0,006)	15,0	72	88	162,7-165,3	163-165
CH ₃ ^d	--	--	--	--	114,2-116,5	113-115
COCH ₃	1,00 (0,005)	15,0	54	75	178,5-181,9	178-179
NO ₂ ^e	--	--	--	--	218,8-220,4	217-219
OH ^f	--	--	--	--	260,4-261,1	259-261

a: benzoato de metila *para*-substituído

b: Tavares, 1993

c: Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie

d: sintetizado e identificado por Masunari (2005)

e: sintetizado e identificado por Rezende (2002)

f: disponível comercialmente, Aldrich Chemical Company, Inc

TABELA 7
Síntese de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas *para-R*-substituídas

Composto (R)	Material de partida ^a g – (mol)	Massa de aldeído ^b g – (mol)	Rendimento (η %)		Faixa de fusão (°C)	
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.
H	0,25 (0,0018)	0,35 (0,0018)	87	--	255,5-261,3	--
Br	0,25 (0,0012)	0,22 (0,0012)	81	--	201,3-203,4	--
Cl	0,25 (0,0015)	0,28 (0,0015)	75	--	208,1-211,8	--
CH ₃	0,25 (0,0017)	0,32 (0,0017)	72	--	202,5-204,5	--

a: benzidrazidas *para*-substituídas

b: 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído

7.1.2. SÍNTESE DE DERIVADOS 5(6)-BENZOFUROXÂNICOS (série II)

Na tabela 8, apresenta-se os dados referentes a etapa final de síntese de 5(6)-benzofuroxano benzidrazidas substituídas.

TABELA 8
Síntese de 5(6)-benzofuroxano benzidrazidas *para-R*-substituídas

Composto (R)	Material de partida ^a g – (mol)	Massa de aldeído ^b g - (mol)	Rendimento (η %)		Faixa de fusão (°C)	
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.
H	0,25 (0,0018)	0,29 (0,0018)	78	--	207,8-208,8	--
Br	0,25 (0,0012)	0,20 (0,0012)	82	--	169,8-173,4	--
Cl	0,25 (0,0015)	0,24 (0,0015)	85	--	241,0-215,8	--
CH ₃	0,25 (0,0017)	0,28(0,0017)	91	--	198,8-200,1	--
COCH ₃	0,25 (0,0014)	0,23 (0,0014)	79	--	154,6-156,1	--
NO ₂	0,25 (0,0014)	0,23 (0,0014)	57	--	204,1-206,2	--
OH	0,25 (0,0017)	0,27 (0,0017)	88	--	295,7-297,1	--

a: benzidrazidas *para*-substituídas

b: 5-formilbenzofuroxano

7.1.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Apresenta-se nas tabelas 9 a 14, os dados referentes à confirmação das estruturas químicas dos compostos das duas séries. Serão apresentadas as leituras dos espectros de Infravermelho, RMN-¹H e RMN-¹³C comuns aos compostos sintetizados.

TABELA 9
Principais bandas de absorção (cm⁻¹) na região do Infravermelho de
5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas *para*-substituídas

R	ν N-H (amida 2 ^a)	ν =C-H (sp ²)	ν C=O (amida)	ν C=C (aromático)	δ N-H (banda II de amida 2 ^a)	ν SO ₂ (assim.)	ν SO ₂ (sim.)	δ C-H (aromático)	ν C-S
H	3230	3140	1622	1581 e 1464	1532	1315	1129	752	594
Br	3265	3155	1639	1595 e 1499	1558	1299	1131	764	589
Cl	3330	3160	1642	1591 e 1492	1540	1296	1130	758	581
CH ₃	3370	3164	1649	1601 e 1498	1576	1305	1136	762	586

TABELA 10
Principais sinais de RMN-¹H (ppm) em DMSO – d₆ de
5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas *para*-substituídas

R	N-H (s, 1H)	N=CH (s, 1H)	Ar-H _{tiófenos} (d, 1H)	J (Hz)	Ar-H _{benzeno} (d, 2H)	J (Hz)	CH ₃ (s, 3H)
H	12,11	8,99	7,89 e 7,79	3,95	7,58 (m,5H)	---	3,41
Br	12,19	8,99	7,90 e 7,79	3,96	7,86 e 7,63	7,54	3,44
Cl	12,17	8,99	7,90 e 7,80	3,68	7,95 e 7,64	7,52	3,44
CH ₃	11,91	8,60	7,67 e 7,46	3,32	7,71 e 7,22	7,58	3,31

Nota: s: singleto; d: duplete, m: multiplete

TABELA 11
Principais sinais de RMN-¹³C (ppm) em DMSO – d₆ de
5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas *para*-substituídas

R	C _{1'}	C _{2'/C_{2''}}	C _{3'/C_{3''}}	C _{4'}	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈
H	133,80	132,00	128,53	133,67	146,30	127,64	134,04	141,43	144,88	156,69	44,98
Br	135,95	133,80	128,53	134,04	148,31	127,64	138,47	143,22	146,36	161,25	47,58
Cl	136,95	132,64	129,10	133,72	146,29	128,34	137,69	142,31	145,57	161,28	47,46
CH ₃	133,97	130,20	129,02	133,65	146,42	127,67	134,01	141,15	142,13	156,67	45,07

TABELA 12
Principais bandas de absorção (cm⁻¹) na região do Infravermelho de
5(6)-benzofuroxano benzidrazidas *para*-substituídas

R	ν N-H (amida 2 ^a)	ν =C-H (sp ²)	ν C=O (amida)	benzofuroxano			δ C-H (aromático)
H	3320	3228	1630	1591	1530	1508	736
Br	3294	3205	1660	1601	1585	1545	762
Cl	3310	3215	1650	1581	1539	1545	754
CH ₃	3426	3235	1654	1611	1582	1537	730
COCH ₃	3380	3226	1673	1615	1585	1532	739
NO ₂	3383	3220	1668	1605	1580	1527	752
OH	3320	3228	1630	1591	1530	1508	758

TABELA 13
Principais sinais de RMN-¹H (ppm) em DMSO – d₆ de
5(6)-benzofuroxano benzidrazidas *para*-substituídas

	N-H	N=CH	Ar-H _{benzofuroxano}			Ar-H _{benzeno}	
R	(s, 1H)	(s, 1H)	(s, 1H)	(d, 2H)	J (Hz)	(d, 2H)	J (Hz)
H	12,12	8,69	8,42	7,83	6,24	7,47 (m, 5H)	--
Br	12,30	8,52	7,97	7,91	7,87	7,78 e 7,71	8,32
Cl	12,15	8,38	8,27	7,84	6,80	7,74 e 7,50	8,34
CH ₃	12,15	8,49	8,36	7,84	5,56	8,03 e 7,33	7,79
COCH ₃	12,29	8,48	8,34	8,03	10,89	7,94 e 7,80	7,73
NO ₂	11,69	8,64	8,32	7,71	8,50	7,58 e 6,49	8,48
OH	12,02	8,49	8,37	8,03	8,01	7,85 e 6,89	7,92

Nota: s: singleto; d: duplete, m: multiplete

TABELA 14
Principais sinais de RMN-¹³C (ppm) em DMSO – d₆ de
5(6)-benzofuroxano benzidrazidas *para*-substituídas

R	C _{1'}	C _{2'/C_{2''}}	C _{3'/C_{3''}}	C _{4'}	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉
H	140,16	128,34	129,10	137,01	137,97	119,29	130,67	118,65	123,37	133,55	145,57	161,41
Br	145,70	137,78	132,14	126,52	145,76	118,80	130,30	124,44	126,35	132,01	149,56	162,91
Cl	145,13	132,68	130,16	145,74	137,40	123,59	129,09	124,86	126,76	132,14	148,34	162,80
CH ₃	142,63	129,47	135,55	145,12	144,40	123,91	130,53	126,12	128,23	132,64	148,33	163,65
COCH ₃	145,26	132,05	137,00	145,95	139,54	124,02	132,63	126,40	128,63	135,29	148,21	162,93
NO ₂	152,79	125,58	119,39	159,54	143,38	113,05	130,17	113,18	123,63	132,97	160,75	163,78
OH	131,88	135,22	123,82	148,34	144,43	115,52	132,64	127,16	130,44	141,87	161,42	163,47

7.2. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

7.2.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA FRENTE À *Staphylococcus aureus* cepa ATCC25923

Todos os compostos sintetizados foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana frente esta cepa, seguindo a metodologia de macrodiluição sucessiva (CLSI, 2006; Collins, 1995), descrito anteriormente.

Os compostos planejados da série I não apresentaram atividade nas concentrações testadas ($\leq 40,00 \mu\text{g/mL}$), e, o aumento desta concentração promove precipitação dos compostos. Por outro lado, esse nível de concentração inviabilizaria o uso destes compostos como agentes antimicrobianos.

Os compostos sintetizados da série II mostraram-se ativos. Apresenta-se na tabela 15, a seguir, as concentrações inibitórias mínimas dos derivados 5(6)-benzofuroxânicos frente à cepa padrão de *Staphylococcus aureus*.

TABELA 15

Concentração inibitória mínima, CIM, de derivados 5(6)-benzofuroxânicos frente à *Staphylococcus aureus*, cepa ATCC 25923.

R	CIM (µg/mL)	
	Fase I	Fase II
-H	20,0 - 40,0	32,00 - 36,00
-Br	10,0 - 20,0	17,80 - 19,20
-Cl	10,0 - 20,0	17,80 - 19,20
-CH ₃	15,0 - 30,0	18,00 - 20,00
-COCH ₃	20,0 - 40,0	30,80 - 35,20
-NO ₂	15,0 - 30,0	14,40 - 16,80
-OH	20,0 - 40,0	27,00 - 30,00

Nota: Leituras de inibição/crescimento realizadas após
18 horas de incubação a 35 °C

7.2.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA FRENTE À *Staphylococcus aureus*, cepas 3SP/R33 e VISA3

Com base nos resultados obtidos nos ensaios frente à cepa padrão de *Staphylococcus aureus*, foram selecionados os dois compostos que demonstraram maior atividade, 5(6)-benzofuroxano 4-nitrobenzidrazida e 5(6)-benzofuroxano 4-clorobenzidrazida, e determinou-se a CIM frente à *Staphylococcus aureus* com caráter de multirresistência, cepas 3SP/R33 e VISA3. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 16.

TABELA 16

Concentração inibitória mínima, CIM, de derivados 5(6)-benzofuroxânicos frente à *Staphylococcus aureus* multirresistente, cepas 3SP/R33 e VISA3.

R	3SP/R33		VISA3	
	CIM (µg/mL)		CIM (µg/mL)	
	Fase I	Fase II	Fase I	Fase II
-Cl	10,0 - 20,0	17,80 - 19,20	10,0 - 20,0	17,80 - 19,20
-NO ₂	15,0 - 30,0	14,40 - 16,80	15,0 - 30,0	14,40 - 16,80

Discussão

8.1. SÍNTESE DOS COMPOSTOS

8.1.1. OBTENÇÃO DE BENZOATOS DE METILA

A obtenção dos ésteres planejados consistiu em reação de esterificação (Solomons, Frihle, 2004; March, 2001; Carey, Sundberg, 2000), figura 20, dos ácidos benzóicos substituídos com metanol anidro em excesso, catalisada por ácido sulfúrico.

FIGURA 20: Mecanismo de esterificação de Fischer (March, 2001).

Esta reação é reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta, esterificação, bem como a reação inversa, que consiste na hidrólise do éster. Assim quando o equilíbrio é atingido, permanece no meio uma considerável quantidade dos reagentes (Solomons, Frihle, 2004). Para deslocar o equilíbrio no sentido da formação dos produtos pode-se utilizar a remoção de um dos produtos ou utilizar excesso de um dos reagentes. Levando-se em consideração estas condições, optou-se pela utilização de excesso de metanol, por ser mais barato e de fácil remoção (March, 2001; Carey, Sundberg, 2000).

Os benzoatos de metila foram identificados por meio de análise da faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados da literatura (*Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie*). O rendimento médio obtido ficou em torno de 82%.

8.1.2. OBTENÇÃO DE BENZIDRAZIDAS *para*-SUBSTITUÍDAS

A obtenção das benzidrazidas planejadas consistiu em reação de amonólise (Solomons, Frihle, 2004; March, 2001; Carey, Sundberg, 2000), figura 21, dos benzoatos de metila substituídos com hidrato de hidrazina 64% (v/v).

FIGURA 21: Mecanismo de reação de amonólise (March, 2001).

Nesta reação, o carbono carbonílico, deficiente em elétrons, sofre ataque nucleofílico da hidrazina, resultando na eliminação do grupo alcóxila ($-\text{OCH}_3$) (Solomons, Frihle, 2004).

As benzidrazidas foram identificadas por meio de análise da faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados da literatura (*Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie*). O rendimento médio obtido ficou em torno de 65%. O baixo rendimento obtido nesta etapa ocorreu provavelmente pela dificuldade de formação dos cristais de benzidrazida, assim como a alta solubilidade em água destes análogos, caracterizando ser esta a etapa limitante, comprometendo desta forma no rendimento global dos compostos.

Ressalta-se que os intermediários *p*-H, *p*-CH₃, *p*-NO₂ benzidrazidas foram previamente sintetizados e identificados pelo nosso grupo de pesquisa (Masunari, Tavares, 2007; 2006; Rezende, 2002) e foram gentilmente cedidos

pelos autores para utilização no presente estudo, sendo necessário apenas fazer a recristalização. Cita-se ainda, que o intermediário *p*-OH benzidrazida foi obtido comercialmente.

8.1.3. SÍNTESE DOS DERIVADOS 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDÊNICOS (série I)

Prepararam-se e identificaram-se quatro 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas *para*-substituídas com os seguintes substituintes: H, Br, Cl, CH₃. Os compostos foram preparados em duas etapas, a saber:

- preparação do aldeído 5-metilsufonil-2-tiofeno carboxaldeído;
- preparação de Bases de Schiff a partir de benzidrazidas substituídas e 5-metilsufonil-2-tiofeno carboxaldeído

8.1.3.1. OBTENÇÃO DE 5-METILSULFONIL-2-CARBOXALDEÍDO

A obtenção do aldeído planejado consistiu em reação de substituição nucleofílica SN₂ (March, 2001; Carey, Sundberg, 2000; Morrison, Boyd, 1994), figura 22, de 5-bromo-2-tiofenocarboxaldeído e o sal metasulfonato de sódio.

FIGURA 22: Mecanismo de reação de substituição nucleofílica SN₂
(March, 2001)

Esta reação se caracteriza pelo encontro de um nucleófilo e um haleto de alquila, onde o nucleófilo ataca diretamente o carbono deslocando o íon haleto (March, 2001; Carey, Sundberg, 2000). O ataque do nucleófilo sempre é

Salomão Dória Jorge

ao longo do eixo de ligação C-X, o caminho de menor energia para a reação. Uma das principais características da reação SN_2 é que o processo provoca uma inversão da configuração do átomo de carbono ligado ao grupo de saída (inversão de Walden) (March, 2001). Outro detalhe importante nesta reação é que não se observa a formação de intermediário iônico (March, 2001).

O aldeído teve sua estrutura química comprovada por meio de análises espectrométricas de IV, RMN - 1H e RMN - ^{13}C e por comparação da faixa de fusão experimental e com da literatura (Kada, Knoppova, Kovac, 1980). Obteve-se rendimento em torno de 75%.

8.1.3.2. OBTENÇÃO DE DERIVADOS 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDÊNICOS

A obtenção dos compostos planejados da série I consistiu na obtenção de Bases de Schiff (Morrison, Boyd, 1994), por meio de um composto carbonílico, 5-metilsulfonil-2-tiofeno carboxaldeído e uma amina, benzidrazidas substituídas.

O método de obtenção das Bases de Schiff a partir de amidas correspondentes, envolve reação de adição nucleofílica (March, 2001; Carey, Sundberg, 2000; Morrison, Boyd, 1994), figura 23. Em decorrência do pH ácido do meio reacional, ocorre protonação do oxigênio carbonílico do grupamento aldeídico tornando-o suscetível ao ataque do nucleófilo. A reação se completa com ataque do nucleófilo a uma amina primária no centro deficiente em elétrons, ocorrendo, então, a liberação de uma molécula de água (March, 2001; Carey, Sundberg, 2000).

Para tanto, o meio reacional deve estar suficientemente ácido para que ocorra a protonação do composto carbonílico, sem permitir decréscimo da concentração de composto nitrogenado livre, por isso a necessidade de mistura de ácidos nesta etapa. Dessa forma, nota-se que a basicidade da amina e a

reatividade da substância carbonílica são as principais condições envolvidas na determinação desta reação (Morrison, Boyd, 1994).

FIGURA 23: Reação de obtenção de bases de Schiff

Os compostos finais tiveram suas estruturas químicas comprovadas por meio de análise espectrométrica de IV, RMN - ^1H e RMN - ^{13}C . Apresenta-se, na tabela 17, a seguir, os rendimentos parciais e totais das etapas de preparação dos compostos desta série.

TABELA 17

Rendimentos parciais e totais das etapas de preparação de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas *para-R*-substituídas

R	Rendimento (η %)			
	Éster	Benzidrazida	Imina	Total*
H**	--	--	87	87
Br	87	69	81	48
Cl	82	72	75	45
CH ₃ **	--	--	72	72

*: η % total = $\frac{\eta\% \text{ éster} \times \eta\% \text{ benzidrazida} \times \eta\% \text{ imina}}{10^4}$

** : não consta os valores de rendimentos referentes à obtenção do éster e da benzidrazida, pois estes compostos encontravam-se disponíveis como benzidrazidas.

8.1.4. SÍNTESE DOS DERIVADOS 5(6)-BENZOFUROXÂNICOS (série II)

Prepararam-se e identificaram-se sete 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas *para*-substituídas com os seguintes substituintes: H, Br, Cl, CH₃, COCH₃, NO₂, OH. Os compostos foram preparados em três etapas, a saber:

- preparação do aldeído 4-azido-3-nitrobenzaldeído;
- preparação de 5-formilbenzofuroxano;
- preparação de Bases de Schiff a partir de benzidrazidas substituídas e 5-formilbenzofuroxano.

8.1.4.1. OBTENÇÃO DE 4-AZIDO-3-NITROBENZALDEÍDO

A obtenção do aldeído planejado consistiu em reação de substituição nucleofílica aromática (March, 2001; Carey, Sundberg, 2000; Morrison, Boyd, 1994), figura 24, entre 4-cloro-3-nitrobenzaldeído e o sal azida de sódio.

FIGURA 24: Mecanismo de reação nucleofílica aromática (March, 2001).

A evidência experimental indica que há duas etapas e por isso o mecanismo de reação às vezes é chamado de *mecanismo de adição/eliminação*. A reação começa com o ataque do nucleófilo ao carbono contendo o grupo abandonador. Esta é a *etapa de adição* da reação. Isto produz um intermediário aniônico. Este íon, conhecido como *complexo de Meisenheimer*, figura 25, é estabilizado por ressonância (March, 2001).

FIGURA 25: Complexo de Meisenheimer estabilizado por ressonância
(March, 2001)

Na segunda etapa da reação, a eliminação ocorre quando o anel sofre rearomatização com a perda do grupo abandonador. Para ocorrer a estabilização por ressonância, é necessário a presença de grupos fortemente retiradores de elétrons em posições *orto* e/ou *para* ao grupo abandonador (March, 2001).

O aldeído teve sua estrutura química comprovada por meio de análise espectrométrica de IV e por comparação da faixa de fusão experimental com a da literatura (Ghosh, Whitehouse, 1968). Obteve-se um rendimento em torno de 44%.

8.1.4.2. OBTENÇÃO DE 5-FORMILBENZOFUROXANO

FIGURA 26: Mecanismo de ciclocondensação

A etapa de obtenção de 5-formilbenzofuroxano consiste em pirólise de o-nitrofenil azidas (Ghosh, Whitehouse, 1968), figura 26. O aquecimento do sistema promove rearranjo molecular (ciclocondensação), com liberação de nitrogênio gasoso. O aldeído teve sua estrutura química comprovada por meio de análise espectrométrica de IV, comparação da faixa de fusão experimental com a da literatura (Ghosh, Whitehouse, 1968) e por análise elementar de C, H, N. Obteve-se rendimento em torno de 75%.

8.1.4.3. OBTENÇÃO DE DERIVADOS 5(6)-BENZOFUROXÂNICOS

A obtenção dos compostos planejados da série II consistiu na obtenção de Bases de Schiff, descrita na seção 8.1.3.2, por meio de um composto carbonílico, 5-formilbenzofuroxano e uma amina, benzidrazidas substituídas.

Em temperatura ambiente, os derivados benzofuroxânicos existem como mistura de tautômeros (Aguirre *et al.*, 2005a, 2005b), ilustrados na figura 27. O benzo-substituinte pode ocupar a posição 5 ou 6 e a proporção de ambos os tautômeros no equilíbrio dependerá de uma série de fatores, como solvente, temperatura, natureza e posição dos substituintes no anel. Mediante as mesmas condições (solvente e temperatura), a presença de grupos retiradores de elétrons geralmente favorece o tautômero 6-substituído, enquanto que a presença de grupos doadores de elétrons favorece o tautômero 5-substituído (Cerecetto *et al.*, 2005). Cita-se que no presente estudo, não foi estudado qual forma tautomérica prevalece no equilíbrio.

FIGURA 27: Equilíbrio tautomérico de derivados benzofuroxânicos

Os compostos finais tiveram suas estruturas químicas comprovadas por meio de análise espectrométrica de IV, RMN - ^1H e RMN - ^{13}C .

Apresenta-se, na tabela 18, a seguir, os rendimentos parciais e totais das etapas de preparação dos compostos desta série.

TABELA 18
Rendimentos parciais e totais das etapas de preparação de
5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas *para-R*-substituídas

R	Rendimento (η %)			
	Éster	Benzidrazida	Imina	Total*
H**	--	--	78	78
Br	82	69	82	46
Cl	82	72	85	50
CH ₃ **	--	--	91	91
COCH ₃	75	54	79	32
NO ₂ **	--	--	57	57
OH**	--	--	88	88

*: η % total = $\frac{\eta\% \text{ éster} \times \eta\% \text{ benzidrazida} \times \eta\% \text{ imina}}{10^4}$

** : não constam os valores de rendimentos referentes à obtenção do éster e da benzidrazida, pois estes compostos encontravam-se disponíveis como benzidrazidas.

8.2. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

Os compostos obtidos foram identificados por análise espectrométrica de IV, RMN- ^1H e RMN- ^{13}C , e seus graus de pureza foram avaliados por determinação da faixa de fusão.

Apresentam-se nas tabelas 19 a 24, as principais bandas de absorção das ligações em comum dos compostos de ambas as séries, analisados por IV, assim como os sinais comuns referentes à análise de hidrogênio e de carbono, analisados por RMN- ^1H , e por RMN- ^{13}C , respectivamente.

TABELA 19

Atribuições para as principais bandas de absorção na região do IV de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas *para*-substituídas (série I)

Bandas de absorção (cm⁻¹)	Atribuição
3300	estiramento N-H (amida 2 ^a)
3100 – 3000	estiramento C-H sp ² (aromático)
1690 – 1650	estiramento –C=N (imina)
1680 – 1630	estiramento C=O (amida)
1640 e 1555	deformação N-H (banda II de amida)
1600 – 1450	estiramento C=C (aromático)
1350 – 1300	estiramento SO ₂ assimétrico
1160 - 1120	estiramento SO ₂ assimétrico
900 – 690	deformação =C-H fora do plano(aromático)

TABELA 20

Atribuições para os principais sinais observados no espectro de RMN - ¹H de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas *para*-substituídas (série I)

Posições do sinais (ppm)	Atribuição
12,00	singleto, 1H ligado ao próton benzamídico
8,50	singleto, 1H ligado ao carbono azometínico
8,17 – 7,96	duplo duplete, 2H do anel benzênico substituído
7,60	duplo duplete, 2H do anel heterocíclico
12,00	singleto, 3H da metila ligado ao grupo SO ₂

TABELA 21

Atribuições para os principais sinais observados no espectro de RMN – ^{13}C de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas *para*-substituídas (série I)

Posições do sinais (ppm)	Atribuição
185 – 155	carbono carbonílico da amida
160 – 155	carbono azometínico
150 – 100	carbono de anel aromático
140 – 115	carbono insaturado sp^2 de heteroaromático
50 - 20	carbono da metila ligado ao SO_2

TABELA 22

Atribuições para as principais bandas de absorção na região do IV de 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas *para*-substituídas (série II)

Bandas de absorção (cm^{-1})	Atribuição
$\cong 3300$	estiramento N-H (amida 2ª)
3100 – 3000	estiramento C-H sp^2 (aromático)
1690 – 1650	estiramento C=O (amida)
1680 – 1600	estiramento $\text{C}=\text{N}$ (imina) combinado com estiramento $\text{C}=\text{N}$ (benzofuroxano)
1640 e 1555	deformação N-H (banda II de amida)
1600 – 1550	estiramento C=C (aromático) combinado com estiramento C=C (benzofuroxano)
1590 - 1520	estiramento N-O-N (benzofuroxano)
900 – 690	deformação $\text{C}=\text{H}$ fora do plano(aromático)

TABELA 23

Atribuições para os principais sinais observados no espectro de RMN - ^1H de 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas *para*-substituídas (série II)

Posições do sinais (ppm)	Atribuição
12,00	singleto, 1H ligado ao próton benzamídico
8,50	singleto, 1H ligado ao carbono azometínico
8,20	singleto, 1H do anel benzofuroxânico
8,10 – 7,90	duplete, 2H do anel benzofuroxânico
7,95 – 7,75	duplo duplete, 2H do anel benzênico substituído

TABELA 24

Atribuições para os principais sinais observados no espectro de RMN – ^{13}C de 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas *para*-substituídas (série II)

Posições do sinais (ppm)	Atribuição
185 – 155	carbono carbonílico da amida
160 – 155	carbono azometínico
150 – 120	carbono de anel aromático do benzofuroxano
130 - 110	carbono de anel aromático

8.3. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

8.3.1. ENSAIO MICROBIOLÓGICO FRENTE À *Staphylococcus aureus*, CEPA ATCC25923

Determinou-se a concentração inibitória mínima dos onze derivados obtidos seguindo metodologia de macrodiluição sucessiva (Masunari, Tavares, 2007; 2006; CLSI, 2006; Collins, 1995; Tavares, 1993). Os métodos de diluição *in vitro* detectam possíveis atividades antimicrobianas de compostos, utilizando métodos celulares sem alvo específico. O ensaio para determinação da

concentração inibitória mínima é obtido através da macrodiluição que consiste em preparar diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólidos ou líquidos, semear a bactéria em estudo e após verificar a menor concentração (maior diluição) do antimicrobiano que inibiu o crescimento do microrganismo. Determina-se a CIM, como sendo a menor concentração que inibe o crescimento do microrganismo, figura 28. Este método apresenta a vantagem de ser qualitativo, podendo ser usado, tanto para amostras hidrossolúveis como lipossolúveis (Collins, 1995).

FIGURA 28: Visualização do ensaio após 18 horas de incubação à 35°C.

Os ensaios foram realizados em triplicata na fase I e em quintuplicata na fase II, com o objetivo de aumentar a confiabilidade dos resultados. Os compostos foram pesados em balança analítica digital de acordo com as alíquotas necessárias para a realização dos mesmos.

Os compostos testados apresentam baixa solubilidade nos meios de cultura, sendo necessário o uso de DMSO como solvente, porém não ultrapassando 12,5% de concentração final, pois estudos realizados

anteriormente demonstraram que acima desta concentração este solvente inibe o crescimento da bactéria em estudo (Tavares, Penna, Amaral, 1997). Cita-se que em todos os ensaios foram realizados testes apenas com solvente nas quantidades usadas nas amostras, sendo que a concentração final de DMSO utilizada foi de 10%.

As leituras de inibição/crescimento microbiano foram realizadas com 18 horas de incubação a 35 °C. As leituras realizadas com 24 e 48 horas de incubação serviram como confirmação de resultados.

Os compostos da série I não apresentaram atividade nas concentrações testadas ($\leq 40,00 \mu\text{g/mL}$). Observou-se, experimentalmente, que o aumento da concentração das soluções a serem empregadas nos testes resultava na precipitação dos compostos nos meios de cultura, mesmo com a utilização de co-solvente, inviabilizando, desta forma, a execução dos ensaios. Acredita-se também, que concentrações muito elevadas de antimicrobianos, como neste caso, certamente inviabilizariam sua aplicação na terapêutica.

8.3.2. ENSAIO MICROBIOLÓGICO FRENTE À *Staphylococcus aureus*, CEPAS 3SP/R33 E VISA3

Avaliou-se a atividade antimicrobiana frente às cepas de *Staphylococcus aureus* com caráter de multirresistência, dos dois derivados 5(6)-benzofuroxânicos que se mostraram mais ativos nos ensaios frente à cepa padrão. A escolha destas duas cepas se deve ao fato de apresentarem resistência a dezenove antibióticos utilizados na terapêutica atual para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, diferindo apenas na sensibilidade diante a vancomicina, como ilustra a tabela 25. A cepa 3SP/R33 é sensível a vancomicina, apresenta uma CIM de vancomicina $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, caracterizando uma cepa MRSA, enquanto que a cepa VISA3 apresenta uma CIM de vancomicina $\geq 8 \mu\text{g/mL}$, caracterizando-a como uma cepa VISA. As recomendações da *Brithish Society for Antimicrobial Chemotherapy* (Palazzo, Araújo, Darini, 2005), são para que as cepas de *Staphylococcus aureus* que apresentarem uma CIM de vancomicina $> 4 \mu\text{g/mL}$

deverão ser consideradas resistentes à vancomicina, uma vez que não respondem ao tratamento com a droga. Entretanto, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* dos Estados Unidos (CLSI, 2006; Palazzo, Araújo, Darini, 2005) determina que as cepas de *Staphylococcus aureus* que apresentarem CIM de vancomicina entre 8 e 16 µg/mL são consideradas como tendo resistência intermediária à vancomicina, e devem, portanto ser chamadas de VISA, enquanto que, apenas as cepas que apresentarem uma CIM ≥ 32 µg/mL são consideradas resistentes à vancomicina, devendo ser chamadas de VRSA. Cabe ressaltar, que, pacientes infectados por cepas que apresentem uma CIM ≥ 8 µg/mL já não respondem ao tratamento com vancomicina (Oliveira et al., 2001).

TABELA 25
Espectro de multirresistência das cepas 3SP/R33 e VISA3 de
Staphylococcus aureus **utilizadas na avaliação antimicrobiana de derivados**
5(6)-benzofuroxânicos

FÁRMACOS	RESISTÊNCIA	
	3SP/R33*	VISA3**
Amoxicilina/Acido Clavulânico	R	R
Ampicilina	R	R
Cefazolina	R	R
Cefotaxima	R	R
Cefalotina	R	R
Ciprofloxacino	R	R
Clindamicina	R	R
Eritromicina	R	R
Gentamicina	R	R
Imipinem	R	R
Nitrofurantoína	R	R
Norfloxacino	R	R
Oxacilina	R	R
Penicilina	R	R
Rifampicina	R	R
Trimetopim/Sulfametoxazol	R	R
Vancomicina	S	I

Nota: R = resistente, S= sensível, I = resistência intermediária

* Oliveira, 1998;

** Oliveira, 2002.

Os dois compostos testados se mostraram ativos frente às cepas multirresistentes e, comparando as concentrações inibitórias mínimas determinadas para estas cepas com a determinada para cepa padrão, tabela 26, observa-se que as atividades antimicrobianas se apresentaram idênticas. Com esse comportamento, podemos sugerir que estes compostos agem nestas três cepas pelo mesmo mecanismo de ação, além de que, as bactérias

com caráter de multirresistência a tantos antibióticos, não desenvolveram ainda mecanismos de resistência aos derivados 5(6)-benzofuroxânicos estudados neste trabalho.

TABELA 26

Concentração inibitória mínima de 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas *p*-substituídas frente às cepas ATCC 25923, 3SP/R33 e VISA3 de *Staphylococcus aureus*

CIM (µg/mL)			
R	ATCC25923	3SP/R33	VISA3
-Cl	17,80 - 19,20	17,80 - 19,20	17,80 - 19,20
-NO ₂	14,40 - 16,80	14,40 - 16,80	14,40 - 16,80

8.4. RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DOS COMPOSTOS

Como pré-requisito para o desencadeamento da atividade biológica em nitrocompostos observa-se a bioativação proporcionada pela redução do grupo nitro, que ao atuar como aceptor de elétrons, resulta na perturbação do fluxo fisiológico de elétrons (Murray *et al.*, 1996). Cabe ressaltar, que, quanto menor for o potencial de redução dos compostos, menor será sua afinidade eletrônica. Apresenta-se na figura 29, a escala de afinidade eletrônica exibida por diferentes classes de compostos nitroaromáticos, incluindo o oxigênio que é o melhor aceptor de elétrons em sistemas biológicos (Hansch, Sammes, Taylor, 1990).

FIGURA 29: Faixas de potenciais de redução para diferentes classes de nitrocompostos (adaptada de Hansch, Sammes, Taylor, 1990).

O limite entre reações redox possíveis de ocorrerem em condições aeróbias ou anaeróbias está ao redor de $-0,35\text{V}$, ou seja, reações redox mais negativas que $-0,35\text{V}$ apenas são possíveis em ausência de oxigênio, ao passo que à direita deste limite reações redox ocorrem facilmente em condições aeróbias.

Os derivados metilsulfonil sofrem eletroredução na ordem de -2 V (Ekström, Ovesson, Pring, 1975), consideravelmente mais negativo que o potencial de redução de nitrocompostos. Desta forma, se os derivados metilsulfonil fossem capazes de interagir com as enzimas redutases da bactéria, o potencial de redução destes compostos seria tão negativo, que seriam incapazes de interferir com fluxo fisiológico de elétrons.

Os compostos da série II, 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas *para*-substituídas, mostraram-se todos ativos, tabela 27.

TABELA 27

Concentração inibitória mínima, CIM, frente à cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*, coeficiente de partição* e efeito eletrônico (σ) do grupo substituinte em 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas para-substituídas

R	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM (μM) ^a	Potência Log(1/CIM) ^{a,b}	ClogP ^c	σ
-H	36,00 – 32,00	127,54	-2,10	1,65	0,00
-Br	19,20 – 17,80	53,16	-1,72	2,61	0,23
-Cl	19,20 – 17,80	60,62	-1,78	2,46	0,23
-CH ₃	20,00 – 18,00	67,50	-1,83	2,15	-0,17
-COCH ₃	35,20 – 30,80	108,54	-2,03	1,46	0,50
-NO ₂	16,80 – 14,00	51,33	-1,71	1,60	0,78
-OH	30,00 – 27,00	100,58	-2,00	1,72	-0,37
Nifuroxazida ^d	3,90 – 2,00 $\mu\text{g/mL}$				
Nitrofurantoína ^e	32,00 – 16,00 $\mu\text{g/mL}$				

a: valores calculados com base no maior valor da faixa de CIM;

b: CIM (μM);

c: Calculado pelo ClogP Program 4.0 – Biobyte Corp. Claremont;

d: Avaliado por Tavares e colaboradores (1997);

e: Jones Jr, Daly, 1993.

Analisando os dados acima, suas atividades foram menores comparando-se com a nifuroxazida, apesar disso, como citado anteriormente, acredita-se que a substituição do sistema 5-nitrofurânico pelo benzofuroxano confere uma menor toxicidade aos análogos em estudo. Com exceção dos

Salomão Dória Jorge

derivados *p*-H e *p*-COCH₃ substituídos, os demais compostos apresentaram uma CIM semelhante a da nitrofurantoína, o que evidencia o forte potencial destes compostos como possíveis agentes antimicrobianos.

Observou-se, ainda, que a atividade destes compostos foi significativamente influenciada pelas propriedades físico-químicas dos grupos substituintes. Constatou-se que o aumento da hidrofobicidade, expressa pelo coeficiente de partição ClogP, promoveu acréscimo da atividade antimicrobiana, em concordância com outros estudos realizados para séries análogas (Masunari, Tavares, 2007; 2006; Masunari *et al.*, 2003; Rezende, 2002; Tavares *et al.*, 1999; Tavares, Penna, Amaral, 1997). Para melhor entendimento, apresenta-se, a seguir, gráfico de dispersão, figura 30, considerando o coeficiente de partição calculado em função da potência antimicrobiana. Com este gráfico é possível observar forte tendência de correlação entre os dois parâmetros.

FIGURA 30: Correlação entre o coeficiente de partição calculado, ClogP, em função da potência antimicrobiana de derivados 5(6)-benzofuroxânicos.

Com base na análise dos parâmetros estatísticos das regressões 30a e 30b, verificou-se que correlação 30b expressou melhor a forte influência da hidrofobicidade sobre a atividade biológica dos derivados 5(6)-benzofuroxânicos.

Analizou-se também a influência do efeito eletrônico dos grupos substituintes na atividade antimicrobiana dos compostos da série II. O grupo nitro por ser forte retirador de elétrons se mostrou como o grupo substituinte com maior influência sobre a atividade desta série. Apresenta-se a seguir gráfico de dispersão, figura 31, considerando efeito eletrônico, expresso pelo σ de Hammett, em função da potência antimicrobiana. Observa-se também tendência de correlação entre estas duas propriedades.

FIGURA 31: Correlação entre efeito eletrônico de *para*-substituintes, expressos através do parâmetro σ de Hammett, em função da potência antimicrobiana de derivados 5(6)-benzofuroxânicos.

Observa-se que a correlação 31b expressou melhor a influência do efeito eletrônico de grupos substituintes sobre a atividade biológica dos compostos estudados.

Com base nos dados acima, fica evidenciado que a atividade antimicrobiana dos derivados 5(6)-benzofuroxânicos é influenciada pelas propriedades físico-químicas de grupos substituintes do anel benzênico, porém é necessário que se amplie a série estudada, a fim de se obter um número de compostos que possa esclarecer a influência quali e quantitativa destas propriedades isoladas ou associadas sobre a atividade antimicrobiana desta série de compostos.

Conclusões

Foram sintetizados e identificados, neste trabalho, quatro derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos (série I) e sete derivados 5(6)-benzofuroxânicos (série II). Suas estruturas químicas foram comprovadas por meio de análise espectrométrica de IV, RMN-¹H e RMN-¹³C. Os rendimentos finais mostraram-se satisfatórios. Por determinação da faixa de fusão comprovou-se o grau de pureza dos compostos. Ressalta-se que os onze compostos apresentam estrutura química inédita.

Todos os compostos planejados foram testados frente à cepa padrão de *Staphylococcus aureus*. Os derivados da série I não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas. Por outro lado, todos os compostos da série II mostraram-se ativos. O composto 5(6)-benzofuroxano 4-nitrobenzidrazida apresentou a maior atividade (CIM = 16,80 µg/mL), enquanto que o derivado 5(6)-benzofuroxano benzidrazida apresentou a menor atividade (CIM = 36,00 µg/mL). Os compostos 5(6)-benzofuroxano 4-nitrobenzidrazida e 5(6)-benzofuroxano 4-clorobenzidrazida foram testados frente a cepas com caráter de multirresistência e ambos demonstraram atividade antimicrobiana (CIM = 16,80 µg/mL e CIM = 19,20 µg/mL).

A análise de relações entre a estrutura e a atividade antimicrobiana dos compostos estudados evidenciou forte tendência de correlação entre coeficiente de partição ou σ de Hammet e a bioatividade dos compostos, sugerindo que a hidrofobicidade e o efeito eletrônico influenciam fortemente o desempenho da atividade antimicrobiana dos derivados 5(6)-benzofuroxânicos.

Referências Bibliográficas

AGUIRRE, G., BOIANI, L., BOIANI, M., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., PORCAL, W., DENICOLA, A., PIRO, O.E., CASTELLANO, E.E., SANT'ANNA, C.M.R., BARREIRO, E.J. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part 3: Substituents-clustering methodology in the search for new active compounds. **Bioorg Med Chem**, San Diego, v.13, n.23, 6324-6335, 2005a.

AGUIRRE, G., BOIANI, L., BOIANI, M., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., PORCAL, W., DENICOLA, A., PIRO, O.E., CASTELLANO, E.E., SANT'ANNA, C.M.R., BARREIRO, E.J. New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Quantitative structure-activity relationship studies. **Bioorg Med Chem**, San Diego, v.13, n.23, 6336-6346, 2005b.

ANDREWS, P.R., TINTELNOT, M. *Intermolecular Forces and Molecular Binding*. In: HANSCH, C., SAMMES, P.G.; TAYLOR, J.B. **Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds**, Oxford: Pergamon Press, v.4, 1990, p.321-347.

AVRIL, J.L., BRIFFORD, J., BEINIS, J.P., DUBRISAY, J. Etude de l'influence de l'antibiothérapie sur les résistances des entérobactéries de l'intestin. **Ann Microbiol**, Paris, v.131B, n.1, p.21-29, 1980.

BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M., MIRANDA, A.L.P., RODRIGUES, C.R. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. **Quim Nova**, São Paulo. v.25. n.1. p.129-148, 2002.

BLACK, J.G., **Microbiologia : fundamentos e perspectivas**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 829p.

BRACHMAN, P.S., BENNETT, J.V. **Hospital infections**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998.

BURGER, A. **Medicinal Chemistry**. 3.ed. New York: Willey-Interscience, 1970.

BURGER, A. Isosterism and bioisosterism in drug design. **Prog Drug Res**, Basel, v.37, p.287-371, 1991.

BUSH, K. Antibacterial drug discovery in the 21st century. **Clin Microbiol Infect Dis**. Nottingham, v.10, supl.4, 10-17, 2004.

CAREY, F.A., SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry**. 4.ed. New York: Plenum Press, 2000. 2pt.

CARVALHO, I., PUPO, M.T., BORGES, A.D.L., BERNARDES, L.S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Quim Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 428-438, 2003.

CDC, Center for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin - United States, 1997, **MMWR**, Atlanta, v.46, n.33, p.813-815, 1997.

CDC, Center for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States, 2002., **MMWR**, Atlanta, n.51, p.565-567, 2002.

As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR-6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2004.

Salomão Dória Jorge

CHAMBERS, H.F., SANDE, M.A. – Os *aminoglicosídeos*. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G., eds. - **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed., New York: McGraw-Hill, 1996, p.812-825.

CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., RISSO, M., SAENZ, P., SEOANE, G., DENICOLA, A., PELUFFO, G., QUIJANO, C., OLEA-AZAR, C. 1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure – Activity Relationships. **J Med Chem**, Columbus, v.42, n.11, 1941-1950, 1999.

CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M., LAVAGGI, M.L., PORCAL, W. Preparation of phenazine *N*⁶,*N*¹⁰-dioxides. Effects of benzofuroxan substituents in the outcome of their expansion reaction with phenolates. **J Braz Chem Soc**, São Paulo, v.16, n.6A, p.1290-1296, 2005.

CHUNG, M.C., FERREIRA, E.I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Quim Nova**, São Paulo. v.22. n.1. p.75-84, 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S16. v.26, n.3, 2006.

COLLINS, C.H., LYNE, P.M., GRANGE, J.M. **Collins and Lyne's Microbiological Methods**. 7.ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1995. 493p.

CRAIG, P.N. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. **J Med Chem**, Columbus, v. 14, n. 8, p. 680-684, 1971.

CROWCROFT, N.S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and antimicrobial use in Belgian hospital. **Infect Contr Hosp Epidem**, Thorofare, v.20, n.1, p.31-36, 1999.

DEARDEN, J.C., BRESNEM, G.M. The measurement of partition-coefficients. **Quant Struct Act Relat**, Weinheim, v.7, n.3, p.133-144, 1988.

DIAS, M.M.L. Pró-fármacos de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos: planejamento, síntese e determinação da atividade antichagásica dos ligantes. São Paulo, 2005. 123p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo)

DODD, M.C.; STILLMAN, W.B. The *in vivo* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimore, v.82, n.1, p.11-18, 1944.

EKSTRÖM, B.; OVESSON, M.; PRING, B.G. Synthesis and antibacterial properties of methylsulfinyl and methylsulfonyl analogs of some nitrofurans. **J Med Chem**, Columbus, v. 18, n. 11, p. 1166-1168, 1975.

FARBER, B.F., MOELLERING, R.C. Retrospective study of the toxicity of the preparations of vancomycin from 1974 to 1981. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.23, n.1. p.139-141, 1983.

FINCH, R., HUNTER, P.A. Antibiotic resistance - action to promote new technologies: report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham, UK. **J Antimicrob Chemother**, Oxford, v.58, supl.S1, p.3–22, 2006.

FOLORUNSO, A.B., ADEYEMI-DORO, F.A., LYON, D.J., CHENG, A.F. Living with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 7-years experience with endemic MRSA in a university hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Chicago, v.18, n.7, p.765–767, 2000.

FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. **Principles of medicinal chemistry**. 4.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.

FRIEDMAN, H.L. Influence of isosteric replacements upon biological activity. **NASNRS**, Washington, v.206, p.295-358, 1951.

FURLANETTO, M. Coacervação complexa de compostos nitro-heterocíclicos. Obtenção de microcápsulas e avaliação da atividade antichagásica. São Paulo, 2005. 99p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo)

GHOSH, P. B.; WHITEHOUSE, M.W. Potential antileukemic and Immunosuppressive Drugs. Preparation and *in Vitro* Pharmacological Activity of Some Benzo-2,1,3-oxadiazoles (Benzofurazans) and Their N-Oxides (Benzofuroxans). **J Med Chem**, Columbus. v.11. p.305-310. 1968.

GOMES, A.R., WEST, H., LENCASTRE, H. de. Origins and Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Lineages. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.50, n.10, p. 3237-3244, 2006.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 9.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 1997, 1014p.

HANSCH, C., FUJITA, T. ρ - σ - π analysis: a method for correlation of biological activity and chemical structure. **J Am Chem Soc**, Columbus, v.86, p.1616-1626, 1964.

HANSCH, C., SAMMES, P.G.; TAYLOR, J.B. **Comprehensive medicinal chemistry: the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds**, Oxford: Pergamon Press, v.4, 1990.

HANSCH, C., LEO, A., TAFT, R.W. A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. **Chem Rev**, Columbus, v.91, p.165-195, 1991.

HANSCH, C., LEO, A., **Exploring QSAR: fundamentals and applications in chemistry and biology**. Washington: American Chemical Society, 1995, 557p.

HANSCH, C., LEO, A., HOECKMAN, D. **Exploring QSAR: hydrophobic, electronic and steric constants**. Washington: American Chemical Society, 1995, 348p.

HAMMETT, L.P. The effect of structure upon the reaction of organic compounds: benzene derivatives. **J Am Chem Soc**, Columbus, v.59, n.1, p.96-103, 1937.

HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 10 ed., New York: McGraw-Hill, 2001, 1171p.

HIRAMATSU, K.; KATAYAMA Y.; YUZAMA H.; ITO, T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int J Med Microbiol**, Stuttgart, v.292, n.2. p. 67-74(8). 2002.

JEVONS, M.P. "Celbenin"-resistant staphylococci. **Br Med J**, England, v.1. p.124-125. 1961.

JONES JR, G.S., DALY, J.S. Antibacterial organophosphorus compounds: phosphoranilidohydrazones of 5-nitro-2-furaldehyde. **J Pharm Sci**, Washington, v.82, n.7, p.755-757. 1993.

KADA, R.; KNOPPOVA, V.; KOVAC, J. The reaction of 2-Cyano-3-(5-Phenylsulfonyl-2-Thienyl) Acrylonitrile with Nucleophiles. **Collect Czech Chem Soc**, Czechoslovak, v.45. p.2360-2363, 1980.

KLOSS, W.E., BANNERMAN, T.L. – *Staphylococcus e micrococcus*. In: MURRAY, P.R., BARON, E., PFALLER, M.A., TENOVER, F.C., YOLKEN, R.H., eds. - **Manual of clinical microbiology**. 8.ed. Washington: American Society for Microbiology, 2003, p.264-282.

KLUYTMANS-VANDENBERGH, M.F.Q.; KLUYTMANS, J.A.J.W. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. **Clin Microbiol Infect Dis**. Nottingham, v.12 supl.1, 9-15, 2006.

- KONEMAN, E.W. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Rio de Janeiro:MEDSCI, 2001, 1465p.
- KOROLKOVAS, A. **Essentials of medicinal chemistry**. 2.ed. New York: Wiley-Interscience, 1988, 1204p.
- KOROLKOVAS, A, FRANÇA, F.F.C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- KUBINYI, H. Lipophilicity and drug activity. **Prog Drug Res**, Basel, v.23, p.97-198, 1979.
- KUBINYI, H. **QSAR: Hansch analysis and related approaches**. New York: VCR, 1993, 240p.
- LANGMUIR, I. Isomorphism, isosterism and covalence. **J Am Chem Soc**, Washington, n.41. p.1543-1559, 1919.
- LEE, V.L., SCOTT, J.H. Antibiotic resistance versus small molecules, the chemical evolution. **Med Res Rev**, New York, v.19. n.6. p.521-542, 1999.
- LEONARD, F., ANDREMONT, A., TANCREDE, C. In vivo activity of nifurzide and nifuroxazide in intestinal bacteria in man and gnotobiotic mice. **J Appl Bacteriol**, Oxford, v.58, p.545-553, 1985.
- LIMA, L.M., BARREIRO, E.J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification and drug design. **Curr Med Chem**, Pakistan, v.12, p.23-49, 2005.
- LOPES, H.V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. **Rev Panam Infectol**, Colombia, v.7. n.3. p.34-36, 2005.
- MANDELL, G.L., PETRI JR, W.A. – *Penicilinas, cefalosporinas e outro antibióticos β -lactâmicos*. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G., eds. - **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed., New York: McGraw-Hill, 1996, p.790-811.
- MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structures**. 5 ed. New York: John Wiley, 2001. 2083p.
- MASUNARI, A. Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR-2D e QSAR-3D de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente (CEB-Clone Endêmico Brasileiro). São Paulo, 2005. 231p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- MASUNARI, A., TAVARES, L.C. Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente. **RBCF/ Braz. J. Pharm. Sci.** v.42, n.3, p.461-471, 2006.
- MASUNARI, A., TAVARES, L.C. A new class of nifuroxazide analogs: synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **Bioorg Med Chem**, San Diego, v.15, 4229-4236, 2007.
- MASUNARI, A., NASCIMENTO, F.L.L., FURLANETTO, M., SANTOS, M.G.B., PENNA, T.C.V., MAMIZUKA, E.M., TAVARES, L.C. Determinação da atividade antimicrobiana de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos frente às cepas padrão e multi-resistente de *Staphylococcus aureus*. In: VII Semana de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, São Paulo. **RBCF/ Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 39, supl.3, p. 192-194, 2003.
- MAYHALL, C.G. **Hospital epidemiology and infection control**. 2.ed., Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 1565p.
- McCULLOCH, J.A. Avaliação da funcionalidade do locus *accessory gene regulator* (agr) em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com susceptibilidade reduzida aos glicopeptídeos. São Paulo, 2006. 128p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

MORRISON, R, BOYD, R. **Química orgânica**. 11.ed., Lisboa: Fundação Caloust Gulbenkian, 1994. 1639p.

MURRAY, R.K., GRANNER, D.K.; MAYES, P.A.; RODWELL, V.M. **Harpe's biochemistry**. 24.ed., Stanford: Appleton & Lange, 1996.

NAKAO, M., SENDA, Y. An epidemiological investigation of hospital infections caused by MRSA and their prevention. **Kaw J Med Welfare**, Kawasaki, v.11, n.1, p.1-11, 2006.

NICOLLE, L.E. BRENDA, D., THOMPSON, G., ROMAN, S., KABANI, A., PLOURDE, P., FAST, M., EMBIL, J. Regional dissemination and control epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Infect Contr Hosp Epidem**, Thorofare, v.20, n.3, p.202-205, 1999.

NORMARK, B.H., NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **J Intern Med**, Oxford, v.252, n.2, p.91-106, 2002.

NORRBY, S., NORD, C., FINCH, R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. **Lancet Infect Dis**, London, v.5, n.2, p.115-119, 2005.

OLIVEIRA, G.A. Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de diferentes regiões do Brasil baseada em métodos genotípicos e fenotípicos. São Paulo, 1998. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

OLIVEIRA, G.A., DELL'AQUILA, A.M., MASIERO, R.L., LEVY, C.E., GOMES, M.S., CUI, L., HIRAMATSU, K., MAMIZUKA, E.M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Thorofare, v.22, n.7, p. 443-448, 2001.

OLIVEIRA, G.A. Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina isoladas no Brasil. São Paulo, 2002 (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

OWENS, R.C., RICE, L. Hospital-Based Strategies for Combating Resistance. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.42. supl.4, p.173-181, 2006.

PALAVECINO, E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Clin Lab Med**, Philadelphia. v.24. n.2. p.403-418, 2004.

PALAZZO, I.C.V, ARAUJO, M.L.C, DARINI, A.L.C. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carrier in Brazil. **J Clin Microbiol**. Oxford, v.43. p-179-185, 2005.

PANLILIO, A.L., CULVER, D.H., GAYNES, R.P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. **Infect Control Hosp Epidemiol**. Thorofare, v.13. p.582-86, 1992.

PATANI, G.A.; LA VOIE, E.J. Bioisosterism: a rational approach in drug design. **Chem. Rev.** v.96, p. 3147-3176, 1996.

REKKER, R.F., MANNHOLD, R. **Calculations of drug lipophilicity**: the hydrophobic fragmental constant approach. Weinheim: VCR, 1992.

REZENDE, P. Relações quantitativas estrutura-atividade de derivados de 5-nitro-2-tiofilidênicos: planejamento, síntese e determinação da atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. São Paulo, 2002. 182p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

RUBINOVITCH, B., PITTET, D. Screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the endemic hospital: what have we learned? **J Hosp Infect**, New York, v.1, n.47, p.9-18, 2001.

RYBAK, M.J., LA PLANTE, K.L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A Review. **Pharmacotherapy**. Carlisle. v.25. n.1. p.74-85, 2005.

SAKOULAS, G., GOLD, H.S., COHEN, R.A., VENKATARAMAN, L., MOELLIRING, R.C., ELIOPOULOS, G.M. Effects of prolonged vancomycin administration on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a patient with recurrent bacteraemia. **J Antimicrob Chemother**, Oxford, v.57, p.589 – 608, 2006.

SILVERMAN, R. B. **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action**. 2.ed. Califórnia: Elsevier Academic Press, 2004. 617p.

SILVERSTEIN, R.M., BASLER, G.C., MORRIL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7.ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. 502p.

SINGER, S.J, NICHOLSON, C.L. The fluid mosaic model of the structure of the cell membrane. **Science**. New York, v.175, p.720-731, 1972.

SKINNER D, KEEFER CS. Significance of bacteremia caused by *S. aureus*; study of 122 cases and review of literature concerned with experimental infection in animals. **Arch Intern Med**, Chicago, v.68. p.851-75. 1941.

SOLOMONS, G., FRYHLE, C. **Organic Chemistry**. 8 ed. New York: John Wiley & Sons, 2004. 1344p.

SONG, J., HIRAMATSU, K., SUH, J.Y., KO, K.S., ITO, T., KAPI, M., KIEM, S., KIM, Y., OH, W.S., PECK, K.R., LEE, N.Y. Emergence in Asian Countries of *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.48. p.4926-4928. 2004.

SPIANDORELLO, W.P., MORSH, F., SEBBEN, S., SPIANDORELLO, F.S.A. A resistência do *Staphylococcus aureus* à oxacilina em hospital de Caxias do Sul. **Revista AMRIGS**. Porto Alegre. v.44. n.3-4. p.120-125. 2000.

SPINK, W.W., FERRIS, V. Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strains of staphylococci. **Science**. New York, v.102. p.221. 1945.

SQUELLA, J. A.; LETELIER, M. E.; LINDERMEYER, L.; NUNES-VERGARA, L. J. Redox behaviour of nifuroxazide: generation of the one-electron reduction product. **Chem Biol Interact**, Limerick, v. 99. p. 227-238. 1996.

SWAIN, C.G., LUPTON Jr, E.C. Field and resonance components of substituent effects. **J Am Chem Soc**, Columbus, v.90, p.4328-4337, 1968.

TAVARES, L. C. Relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade antimicrobiana de análogos à Nifuroxazida. São Paulo, 1993. (Dissertação – Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

TAVARES, L.C., AMARAL, A.T. Partition coefficient determination of nitrofurans derivatives for a QSAR study. IN: WORKSHOP ON CHEMICAL STRUCTURE-BIOLOGICAL ACTIVITY. São Paulo. 1991. **Resumos dos Trabalhos**. São Paulo. I.Q./USP. 1991. p.8.

TAVARES, L.C., AMARAL, A.T. Efeito eletrônico de substituintes sobre a polaridade do grupo carbonila e atividade anestésica local de N-[(dimetilamino) metil] benzamidas 4-substituídas. **Rev Farm Bioq, USP**, v.33. n.2., p.123-129, 1997).

TAVARES, L.C., VESSONI-PENNA, T.C., AMARAL, A.T. A QSAR study of nitrofurans derivatives with antimicrobial activity. IN: WORKSHOP ON CHEMICAL STRUCTURE-BIOLOGICAL ACTIVITY. São Paulo. 1991. **Resumos dos Trabalhos**. São Paulo. I.Q./USP. 1991. p.2.

TAVARES, L.C., PENNA, T.C.V., AMARAL, A.T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. **Boll Quim Farm**, Milano, v.136, n.3, p.244-9, 1997.

TAVARES, L. C., CHISTÉ, J. J., SANTOS, M. G. B., PENNA, T. C. V. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs II. **Boll Chim Farm**, Milano, v. 138, n. 8, p. 432-436, 1999.

TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Quim Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

TENOVER, C.F., BIDDLE, J.W., LANCASTER, M.V. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infect Dis**, Atlanta, v.7, n.2, p.327-332, 2001.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. São Paulo: Artmed editora, 2005, 894p.

TORVALDSEN, S. the continuing evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in western Australia. **Infect Control Hosp Epidem**, Thorofare, v.20, n.2, p.133-135, 1999.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: editora Atheneu, 2005, 718p.

TUMBARELLO, M., DONATI, K.G., TACCONELLI, E., CITTON, R., SPANU, T., LEONE, F., FADDA, G., CAUDA, R. Risk factors and predictors of mortality of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia in HIV-infected patients. **J Antimicrob Chemother**, Oxford, v.50, p.375-382, 2002.

UTSUI, Y; YAKOTA, T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin and cephen-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.28, p.397-403, 1985.

VIODÉ, C.; BETTACHE, N.; CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; CHAVIÉRE, G.; BALAKARA, N.; PÉRIE, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. **Biochem Pharmacol**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 549-557, 1999.

WENZEL, R.P., EDMOND, M. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: infection control considerations. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.27. p.245-251, 1998.

Anexos

Anexo 1.***Procedimento experimental para o preparo de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas substituídas (série I) e 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas substituídas (série II)*****SÍNTESE DOS DERIVADOS 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDÊNICOS (série I)****• OBTENÇÃO DE 5-METILSULFONIL-2-TIOFENOCARBOXALDEÍDO**

Adicionaram-se 1,02 g (0,01 mol) metilsufinato de sódio e 1,91 g (0,01 mol) 5-bromo-2-tiofenocarboxaldeído em 30 mL de dimetilformamida. A mistura foi aquecida a 130-140 °C por quatro horas. Depois de esfriar, 60 mL de água destilada foram adicionadas a esta mistura, e após, realizou-se extrações com clorofórmio. Adicionou-se sulfato de magnésio anidro para eliminar quantidades restantes de água. Evaporou-se o clorofórmio até obtenção de um óleo. A cristalização foi feita com etanol quente. Observou-se a formação de cristais aciculares brancos, que foram filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DA 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDENO BENZIDRAZIDA**• OBTENÇÃO DA 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDENO BENZIDRAZIDA**

Adicionou-se 0,35 g (0,0018 mol) de 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído em mistura contendo água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético e metanol anidro na proporção de 8:7:8:20(v/v) (Tavares, 1993). A mistura foi aquecida até a temperatura de refluxo e, em seguida, adicionou-se 0,25 g (0,0018 mol) de benzidrazida (Masunari, Tavares, 2006) lentamente sob agitação constante. Observou-se a formação de sólido, que foi filtrado, lavado com água destilada e recristalizado em DMF/água, obtendo-se cristais de aspecto amorfo e coloração amarela, que foram novamente filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DA 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDENO 4-BROMOBENZIDRAZIDA

• OBTENÇÃO DO 4-BROMOBENZOATO DE METILA

Adicionou-se 2,50 g (0,012 mol) de ácido 4-bromobenzoico, em 25,0 mL (0,62 mol) de metanol anidro e 0,5 mL (0,01 mol) de ácido sulfúrico concentrado. Manteve-se a mistura reacional sob refluxo por quatro horas. O metanol foi evaporado e o éster formado lavado com água destilada.

• OBTENÇÃO DA 4-BROMOBENZIDRAZIDA

Adicionou-se 1,0 g (0,005 mol) de 4-bromobenzoato de metila sobre 15,0 mL (0,17 mol) de hidrato de hidrazina 64% (v/v). Manteve-se a mistura reacional sob refluxo por dez minutos. Em seguida resfriou-se a reação em banhos seqüenciais de água, gelo e gelo seco com metanol. Observou-se a formação de cristais aciculares brancos, que foram filtrados, lavados com água destilada e secos.

• OBTENÇÃO DA 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDENO 4-BROMOBENZIDRAZIDA

Adicionou-se 0,22 g (0,0012 mol) de 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído em mistura contendo água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético e metanol anidro na proporção de 8:7:8:20(v/v) (Tavares, 1993). A mistura foi aquecida até a temperatura de refluxo e, em seguida, adicionou-se 0,25 g (0,0012 mol) de 4-bromobenzidrazida lentamente sob agitação constante. Observou-se a formação de sólido, que foi filtrado, lavado com água destilada e recristalizado em DMF/água, obtendo-se cristais de aspecto amorfo e coloração amarela, que foram novamente filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DA 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDENO 4-CLOROBENZIDRAZIDA

• OBTENÇÃO DO 4-CLOROBENZOATO DE METILA

Adicionou-se 2,50 g (0,016 mol) de ácido 4-clorobenzoico, em 25,0 mL (0,62 mol) de metanol anidro e 0,5 mL (0,01 mol) de ácido sulfúrico concentrado. Manteve-se a mistura reacional sob refluxo por quatro horas. O metanol foi evaporado e o éster formado lavado com água destilada.

- **OBTENÇÃO DA 4-CLOROBENZIDRAZIDA**

Adicionou-se 1,0 g (0,006 mol) de 4-clorobenzoato de metila sobre 15,0 mL (0,17mol) de hidrato de hidrazina 64% (v/v). Manteve-se a mistura reacional sob refluxo por dez minutos. Em seguida resfriou-se a reação em banhos seqüenciais de água, gelo e gelo seco com metanol. Observou-se a formação de cristais aciculares brancos, que foram filtrados, lavados com água destilada e secos.

- **OBTENÇÃO DA 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDENO 4-CLOROBENZIDRAZIDA**

Adicionaram-se 0,28 g (0,0015 mol) de 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído em mistura contendo água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético e metanol anidro na proporção de 8:7:8:20(v/v) (Tavares, 1993). A mistura foi aquecida até a temperatura de refluxo e, em seguida, adicionou-se 0,25 g (0,0015 mol) de 4-clorobenzidrazida lentamente sob agitação constante. Observou-se a formação de sólido, que foi filtrado, lavado com água destilada e recristalizado em DMF/água, obtendo-se cristais de aspecto amorfo e coloração amarela, que foram novamente filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DA 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDENO 4-METILBENZIDRAZIDA

- **OBTENÇÃO DA 5-METILSULFONIL-2-TIOFILIDENO 4-METILBENZIDRAZIDA**

Adicionou-se 0,32 g (0,0017 mol) de 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído em mistura contendo água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético e metanol anidro na proporção de 8:7:8:20(v/v) (Tavares, 1993). A mistura foi aquecida até a temperatura de refluxo e, em seguida, adicionou-se 0,25 g (0,0017 mol) de 4-metilbenzidrazida (Masunari, Tavares, 2006) lentamente sob agitação constante. Observou-se a formação de sólido, que foi filtrado, lavado com água destilada e recristalizado em DMF/água, obtendo-se cristais de aspecto amorfo e coloração amarela, que foram novamente filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DOS DERIVADOS 5(6)-BENZOFUROXÂNICOS (série II)

• OBTENÇÃO DE 4-AZIDO-3-NITROBENZALDEÍDO

Adicionaram-se 1,00 g (0,015 mol) de azida de sódio e 4,0 g (0,021 mol) de 4-cloro-3-nitrobenzaldeído em 30 mL de dimetilsulfóxido. A mistura foi aquecida a 130-140°C por trinta minutos. Depois de esfriar, 100 mL de água destilada foram adicionadas a esta mistura, e após, realizou-se extrações com éter etílico. Adicionou-se sulfato de magnésio anidro para eliminar quantidades restantes de água. Evaporou-se o éter até obtenção de um óleo. A cristalização foi feita com etanol. Observou-se a formação de cristais aciculares amarelos, que foram filtrados, lavados com água destilada e secos.

• OBTENÇÃO DE 5-FORMILBENZOFUROXANO

Adicionou-se 1,0 g (0,005 mol) de 4-azido-3-nitrobenzaldeído em 15 mL de tolueno. A mistura foi aquecida até refluxo e mantida por trinta minutos. Evaporou-se o tolueno e o óleo obtido foi redissolvido em 5 mL de acetato de etila. Adicionou-se éter de petróleo e a solução foi resfriada. A recristalização foi feita em etanol/água. Observou-se a formação de cristais aciculares amarelos, que foram filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DA 5(6)-BENZOFUROXANO BENZIDRAZIDA

• OBTENÇÃO DA 5(6)-BENZOFUROXANO BENZIDRAZIDA

Adicionou-se 0,29 g (0,0018 mol) de 5-formilbenzofuroxano em mistura contendo água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético e metanol anidro na proporção de 8:7:8:20(v/v) (Tavares, 1993). A mistura foi aquecida até a temperatura de refluxo e, em seguida, adicionou-se 0,25 g (0,0018 mol) de benzidrazida (Masunari, Tavares, 2006) lentamente sob agitação constante. Observou-se a formação de sólido, que foi filtrado, lavado com água destilada e recristalizado em DMF/água, obtendo-se cristais de aspecto amorfo e coloração amarela, que foram novamente filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-BROMOBENZIDRAZIDA

• OBTENÇÃO DO 4-BROMOBENZOATO DE METILA

Adicionou-se 2,50 g (0,012 mol) de ácido 4-bromobenzoico, em 25,0 mL (0,62 mol) de metanol anidro e 0,5 mL (0,01 mol) de ácido sulfúrico concentrado. Manteve-se a mistura reacional sob refluxo por quatro horas. O metanol foi evaporado e o éster formado lavado com água destilada.

• OBTENÇÃO DA 4-BROMOBENZIDRAZIDA

Adicionou-se 1,0 g (0,005 mol) de 4-bromobenzoato de metila sobre 15,0 mL (0,17 mol) de hidrato de hidrazina 64% (v/v). Manteve-se a mistura reacional sob refluxo por dez minutos. Em seguida resfriou-se a reação em banhos seqüenciais de água, gelo e gelo seco com metanol. Observou-se a formação de cristais aciculares brancos, que foram filtrados, lavados com água destilada e secos.

• OBTENÇÃO DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-BROMOBENZIDRAZIDA

Adicionou-se 0,20 g (0,0012 mol) de 5-formilbenzofuroxano em mistura contendo água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético e metanol anidro na proporção de 8:7:8:20(v/v) (Tavares, 1993). A mistura foi aquecida até a temperatura de refluxo e, em seguida, adicionou-se 0,25 g (0,0012 mol) de 4-bromobenzidrazida lentamente sob agitação constante. Observou-se a formação de sólido, que foi filtrado, lavado com água destilada e recristalizado em DMF/água, obtendo-se cristais de aspecto amorfo e coloração laranja escuro, que foram novamente filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-CLOROBENZIDRAZIDA

• OBTENÇÃO DO 4-CLOROBENZOATO DE METILA

Adicionou-se 2,50 g (0,016 mol) de ácido 4-clorobenzoico, em 25,0 mL (0,62 mol) de metanol anidro e 0,5 mL (0,01 mol) de ácido sulfúrico concentrado. Manteve-se a mistura reacional sob refluxo por quatro horas. O metanol foi evaporado e o éster formado lavado com água destilada.

- **OBTENÇÃO DA 4-CLOROBENZIDRAZIDA**

Adicionou-se 1,0 g (0,006 mol) de 4-clorobenzoato de metila sobre 15,0 mL (0,17mol) de hidrato de hidrazina 64% (v/v). Manteve-se a mistura reacional sob refluxo por dez minutos. Em seguida resfriou-se a reação em banhos seqüenciais de água, gelo e gelo seco com metanol. Observou-se a formação de cristais aciculares brancos, que foram filtrados, lavados com água destilada e secos.

- **OBTENÇÃO DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-CLOROBENZIDRAZIDA**

Adicionou-se 0,24 g (0,0015 mol) de 5-formilbenzofuroxano em mistura contendo água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético e metanol anidro na proporção de 8:7:8:20(v/v) (Tavares, 1993). A mistura foi aquecida até a temperatura de refluxo e, em seguida, adicionou-se 0,25 g (0,0015 mol) de 4-clorobenzidrazida lentamente sob agitação constante. Observou-se a formação de sólido, que foi filtrado, lavado com água destilada e recristalizado em DMF/água, obtendo-se cristais de aspecto amorfo e coloração amarela, que foram novamente filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-METILBENZIDRAZIDA

- **OBTENÇÃO DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-METILBENZIDRAZIDA**

Adicionou-se 0,28 g (0,0017 mol) de 5-formilbenzofuroxano em mistura contendo água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético e metanol anidro na proporção de 8:7:8:20(v/v) (Tavares, 1993). A mistura foi aquecida até a temperatura de refluxo e, em seguida, adicionaram-se 0,25 g (0,0017 mol) de 4-metilbenzidrazida (Masunari, Tavares, 2006) lentamente sob agitação constante. Observou-se a formação de sólido, que foi filtrado, lavado com água destilada e recristalizado em DMF/água, obtendo-se cristais de aspecto amorfo e coloração amarela, que foram novamente filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-ACETILBENZIDRAZIDA

• OBTENÇÃO DO 4-ACETILBENZOATO DE METILA

Adicionou-se 2,00 g (0,012 mol) de ácido 4-acetilbenzóico, em 25,0 mL (0,62 mol) de metanol anidro e 0,5 mL (0,01 mol) de ácido sulfúrico concentrado. Manteve-se a mistura reacional sob refluxo por quatro horas. O metanol foi evaporado e o éster formado lavado com água destilada.

• OBTENÇÃO DA 4-ACETILBENZIDRAZIDA

Adicionou-se 1,0 g (0,005 mol) de 4-acetilbenzoato de metila sobre 15,0 mL (0,17 mol) de hidrato de hidrazina 64% (v/v). Manteve-se a mistura reacional sob refluxo por dez minutos. Em seguida resfriou-se a reação em banhos seqüenciais de água, gelo e gelo seco com metanol. Observou-se a formação de cristais aciculares brancos, que foram filtrados, lavados com água destilada e secos.

• OBTENÇÃO DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-ACETILBENZIDRAZIDA

Adicionou-se 0,23 g (0,0014 mol) de 5-formilbenzofuroxano em mistura contendo água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético e metanol anidro na proporção de 8:7:8:20(v/v) (Tavares, 1993). A mistura foi aquecida até a temperatura de refluxo e, em seguida, adicionou-se 0,25 g (0,0014 mol) de 4-acetilbenzidrazida lentamente sob agitação constante. Observou-se a formação de sólido, que foi filtrado, lavado com água destilada e recristalizado em DMF/água, obtendo-se cristais de aspecto amorfo e coloração laranja, que foram novamente filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-NITROBENZIDRAZIDA

• OBTENÇÃO DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-NITROBENZIDRAZIDA

Adicionou-se 0,23 g (0,0014 mol) de 5-formilbenzofuroxano em mistura contendo água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético e metanol anidro na proporção de 8:7:8:20(v/v) (Tavares, 1993). A mistura foi aquecida até a temperatura de refluxo e, em seguida, adicionaram-se 0,25 g (0,0014 mol) de 4-nitrobenzidrazida (Rezende, 2002) lentamente sob agitação constante. Observou-se a formação de sólido, que foi

filtrado, lavado com água destilada e recristalizado em DMF/água, obtendo-se cristais de aspecto amorfo e coloração amarela, que foram novamente filtrados, lavados com água destilada e secos.

SÍNTESE DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-HIDROXIBENZIDRAZIDA

● OBTENÇÃO DA 5(6)-BENZOFUROXANO 4-HIDROXIBENZIDRAZIDA

Adicionou-se 0,27 g (0,0017 mol) de 5-formilbenzofuroxano em mistura contendo água destilada, ácido sulfúrico concentrado, ácido acético e metanol anidro na proporção de 8:7:8:20(v/v) (Tavares, 1993). A mistura foi aquecida até a temperatura de refluxo e, em seguida, adicionou-se 0,25 g (0,0017 mol) de 4-hidroxibenzidrazida lentamente sob agitação constante. Observou-se a formação de sólido, que foi filtrado, lavado com água destilada e recristalizado em DMF/água, obtendo-se cristais de aspecto amorfo e coloração amarela, que foram novamente filtrados, lavados com água destilada e secos.

Anexo 2.**Estruturas químicas dos derivados 5-metilsulfonil-2-tiofilidênicos (série I)** *5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazida* *5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-bromobenzidrazida* *5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-clorobenzidrazida* *5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-metilbenzidrazida***Estrutura química dos derivados 5(6)-benzofuroxânicos (série II)** *5(6)-benzofuroxano benzidrazida* *5(6)-benzofuroxano 4-bromobenzidrazida* *5(6)-benzofuroxano 4-clorobenzidrazida* *5(6)-benzofuroxano 4-metilbenzidrazida*

5(6)-benzofuroxano 4-acetilbenzidrazida

5(6)-benzofuroxano 4-nitrobenzidrazida

5(6)-benzofuroxano 4-hidroxibenzidrazida

Anexo 3.

Espectros de IV, RMN-¹H e RMN-¹³C de 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazidas substituídas (série I) e 5(6)-benzofuroxanos benzidrazidas substituídas (série II)

5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído

Espectro de IV do 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ¹H do 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído.
solvente: DMSO – d₆ / padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN - ¹³C/APT do 5-metilsulfonil-2-tiofenocarboxaldeído.
solvente: DMSO – d₆ / padrão de referência interna: TMS

5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazida

Espectro de IV da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazida, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ¹H da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazida.
solvente: DMSO – *d*₆/ padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN – ¹³C da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno benzidrazida.
solvente: DMSO – *d*₆/ padrão de referência interna: TMS

5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-bromobenzidrazida

Espectro de IV da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-bromobenzidrazida, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ¹H da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-bromobenzidrazida.
solvente: DMSO – d₆/ padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN – ¹³C da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-bromobenzidrazida.
solvente: DMSO – d₆/ padrão de referência interna: TMS

5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-clorobenzidrazida

Espectro de IV da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-clorobenzidrazida, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ^1H da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-clorobenzidrazida.
solvente: DMSO - d_6 / padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN - ^{13}C da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-clorobenzidrazida.
solvente: DMSO - d_6 / padrão de referência interna: TMS

5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-metilbenzidrazida

Espectro de IV da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-metilbenzidrazida, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ^1H da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-metilbenzidrazida.
solvente: DMSO - d_6 / padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN – ^{13}C da 5-metilsulfonil-2-tiofilideno 4-metilbenzidrazida.
solvente: DMSO – d_6 / padrão de referência interna: TMS

5-formilbenzofuroxano

Espectro de IV do 5-formilbenzofuroxano, utilizando dispersão em KBr.

Análise elementar do 5-formilbenzofuroxano

Fórmula molecular	Massa molecular	%C		%H		%N	
		Exp.	Calc.	Exp.	Calc.	Exp.	Calc.
C ₇ H ₄ N ₂ O ₃	164,02	51,57	51,23	2,51	2,46	17,01	17,07
		51,57		2,38		16,85

Espectro de RMN - ¹H do 5-formilbenzofuroxano.
solvente: DMSO – d₆ / padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN - ¹³C do 5-formilbenzofuroxano.
solvente: DMSO – d₆ / padrão de referência interna: TMS

5(6)-benzofuroxano benzidrazida

Espectro de IV da 5(6)-benzofuroxano benzidrazida, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ¹H da 5(6)-benzofuroxano benzidrazida.
solvente: DMSO – *d*₆/ padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN – ¹³C da 5(6)-benzofuroxano benzidrazida.
solvente: DMSO – *d*₆/ padrão de referência interna: TMS

5(6)-benzofuroxano 4-bromobenzidrazida

Espectro de IV da 5(6)-benzofuroxano 4-bromobenzidrazida, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ^1H da 5(6)-benzofuroxano 4-bromobenzidrazida.
solvente: DMSO - d_6 / padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN - ^{13}C da 5(6)-benzofuroxano 4-bromobenzidrazida.
solvente: DMSO - d_6 / padrão de referência interna: TMS

5(6)-benzofuroxano 4-clorobenzidrazida

Espectro de IV da 5(6)-benzofuroxano 4-clorobenzidrazida, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ^1H da 5(6)-benzofuroxano 4-clorobenzidrazida.
solvente: DMSO - d_6 / padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN - ^{13}C da 5(6)-benzofuroxano 4-clorobenzidrazida.
solvente: DMSO - d_6 / padrão de referência interna: TMS

5(6)-benzofuroxano 4-metilbenzidrazida

Espectro de IV da 5(6)-benzofuroxano 4-metilbenzidrazida, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ¹H da 5(6)-benzofuroxano 4-metilbenzidrazida.
solvente: DMSO – d₆ / padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN – ¹³C da 5(6)-benzofuroxano 4-metilbenzidrazida.
solvente: DMSO – d₆ / padrão de referência interna: TMS

5(6)-benzofuroxano 4-acetilbenzidrazida

Espectro de IV da 5(6)-benzofuroxano 4-acetilbenzidrazida, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ^1H da 5(6)-benzofuroxano 4-acetilbenzidrazida.
solvente: DMSO - d_6 / padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN - ^{13}C da 5(6)-benzofuroxano 4-acetilbenzidrazida.
solvente: DMSO - d_6 / padrão de referência interna: TMS

5(6)-benzofuroxano 4-nitrobenzidrazida

Espectro de IV da 5(6)-benzofuroxano 4-nitrobenzidrazida, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ¹H da 5(6)-benzofuroxano 4-nitrobenzidrazida.
solvente: DMSO - d₆ / padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN - ¹³C da 5(6)-benzofuroxano 4-nitrobenzidrazida.
solvente: DMSO - d₆ / padrão de referência interna: TMS

5(6)-benzofuroxano 4-hidroxibenzidrazida

Espectro de IV da 5(6)-benzofuroxano 4-hidroxibenzidrazida, utilizando dispersão em KBr.

Espectro de RMN - ¹H da 5(6)-benzofuroxano 4-hidroxi**benzidrazida**.
solvente: DMSO – d₆/ padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN – ¹³C da 5(6)-benzofuroxano 4-hidroxi**benzidrazida**.
solvente: DMSO – d₆/ padrão de referência interna: TMS