

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia Químico-Farmacêutica

Planejamento, síntese, determinação da atividade biológica e estudos de QSAR-2D de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos frente ao *Trypanosoma cruzi*

Alex Alfredo de Oliveira

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares

São Paulo

2011

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

O48p Oliveira, Alex Alfredo de
Planejamento, síntese, determinação da atividade biológica e estudos de QSAR-2D de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos frente ao *Trypanosoma cruzi* / Alex Alfredo de Oliveira. -- São Paulo, 2011.
113p

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

1. Química medicinal 2. Relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica (QSAR) : Química farmacêutica 3. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 4. Fármaco : Síntese : Química farmacêutica 5. Quimioterápicos : Química farmacêutica I. T. II. Tavares, Leoberto Costa, orientador.

615.19 CDD

Alex Alfredo de Oliveira

Planejamento, síntese, determinação da atividade biológica e estudos de QSAR-2D de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos frente ao *Trypanosoma cruzi*

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de mestre

Versão Corrigida

Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares

Orientador/presidente

1°. Examinador

2°. Examinador

São Paulo, _____ de 2011

AGRADECIMENTOS

- ✓ *Ao Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares, pelo apoio, pela compreensão, pela confiança, pelos ensinamentos e por toda benevolência.*
- ✓ *À minha maravilhosa família pelo amor, pela atenção, pelo incentivo e pelas orações para que Deus sempre iluminasse meus caminhos.*
- ✓ *Aos meus amigos de laboratório, Dr. Salomão Doria Jorge, Profa. Dra. Marina Ishii e Fanny Palace-Berl, por compartilharem comigo seus conhecimentos, que foram essenciais para a execução deste trabalho, e pelos momentos de descontração.*
- ✓ *Aos colegas de laboratório, João Sussumo, Rodrigo Rocha Zorzi e Leandro de Sá Botolozzo, por toda ajuda.*
- ✓ *Às minhas tias Joana e Dirce (in memoriam) que me acompanharam efetivamente em todas as etapas da minha vida e que sempre estarão comigo me incentivando, através dos seus exemplos de vida.*
- ✓ *Aos meus amigos José Eduardo Gonçalves e Mariane Ballerini Fernandes, por toda ajuda, pela atenção e pelo companheirismo.*
- ✓ *Aos funcionários da secretaria do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Juarez, Elza e Mirian, por toda diligência.*
- ✓ *Aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação, Jorge e Elaine, pela solicitude.*
- ✓ *Às agências de fomento CAPES, CNPq e Fapesp, pelo apoio financeiro.*
- ✓ *À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pelo suporte.*
- ✓ *Às inúmeras pessoas que não foram mencionadas, porém que deram imensa contribuição para realização deste sonho.*

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 DOENÇA DE CHAGAS	4
3.1.1 APECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	4
3.1.2 CICLO EVOLUTIVO	6
3.1.3 TRATAMENTO	7
3.2 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	9
3.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DETERMINANTES PARA AÇÃO DE FÁRMACOS	13
3.3.1 HIDROFOBICIDADE.....	14
3.3.1.1 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (LOG P)	16
3.3.1.2 DETERMINAÇÃO DO LOG P	17
3.3.1.3 PARÂMETRO DE HANSCH E FUJITA (II).....	18
3.3.2 EFEITOS ELETRÔNICOS	18
3.3.2.1 CONSTANTE DE HAMMETT	19
3.3.2.2 CONSTANTES DE SWAIN (S) E LUPTON (R).....	22
3.3.3 PARÂMETROS ESTEREOQUÍMICOS	22

3.4 PLANEJAMENTO DE SÉRIES DE COMPOSTOS PARA ESTUDOS DE QSAR.....	24
3.5 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE	25
3.5.1 MODELOS UTILIZADOS EM QSAR.....	27
3.6 COMPOSTOS NITRO-HETEROCÍCLICOS.....	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 SÍNTESE.....	33
4.1.1 PLANEJAMENTO DA SÉRIE	33
4.1.2 SÍNTESE DA SÉRIE DE DERIVADOS 1,3,4-OXADIAZOLÍNICOS	33
4.1.2.1 OBTENÇÃO DAS BASES DE SCHIFF	34
4.1.2.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS 1,3,4-OXADIAZOLÍNICOS	35
4.1.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	35
4.1.3.1 FAIXA DE FUSÃO.....	35
4.1.3.2 . ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	35
4.1.3.3 ANÁLISE ELEMENTAR DE CHN	36
4.1.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA ANTI- <i>T. CRUZI</i>	36
4.1.4.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE COMPOSTOS A SEREM AVALIADOS.....	36
4.1.4.2 DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 SÍNTESE E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS	41
5.1.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS.....	41
5.1.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	41
5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-<i>T. cruzi</i>	47
5.3 ANÁLISE DE HANSCH	57

6 DISCUSSÃO	60
6.1.1 OBTENÇÃO DAS BASES DE SCHIFF	61
6.1.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS 1,3,4-OXADIAZOLÍNICOS	62
6.2 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS	66
6.2.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE HIDROGÊNIO – RMN ¹ H.....	66
6.2.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE CARBONO – RMN ¹³ C	67
6.2.3 ANÁLISE ELEMENTAR – CHN E FAIXA DE FUSÃO.....	68
6.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA	69
6.4 ESTUDO QUANTITATIVO DE RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE EM DUAS DIMENSÕES – QSAR-2D	70
6.4.1 DADOS BIOLÓGICOS PARA ESTUDOS DE QSAR.....	70
6.4.2 ANÁLISE DE HANSCH.....	71
7 CONCLUSÕES	79
8 REFERÊNCIAS	80
9 ANEXOS: ESPECTROS DE RMN ¹H E RMN ¹³C DA SÉRIE DE COMPOSTOS DERIVADOS 1,3,4-OXADIAZOLÍNICOS	89
9.1 ANEXO A: Espectros de RMN ¹H da série 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituídas]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	90
9.2 ANEXO B: Espectro de RMN ¹³C da série 2-[5-nitro-tiofen-2il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituídas]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Casos notificados da doença de Chagas em regiões endêmicas e não endêmicas.....	5
Figura 2: Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i>	6
Figura 3: Estrutura de fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas	8
Figura 4: Etapas para o planejamento e o desenvolvimento de novos fármacos.	10
Figura 5: Etapas do processo de desenvolvimento de novos fármacos.....	13
Figura 6: Modelo do mosaico fluido proposto por Singer e Nicholson em 1972.....	15
Figura 7: Reação de ionização de ácidos benzoicos <i>para</i> ou <i>meta</i> substituídos	19
Figura 8: Direção vetorial dos parâmetros de esterimol, L, B ₁ , B ₂ , B ₃ , B ₄ e B ₅	24
Figura 9: Diagrama proposto por Craig para escolha de grupos substituintes.....	25
Figura 10: Compostos nitrofurânicos utilizados na terapêutica	30
Figura 11: Grupo farmacofórico de compostos nitrofurânicos	30
Figura 12: Biorredução do grupo nitro.....	31
Figura 13: Diagrama de Craig apresentando o planejamento para série dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos.	33
Figura 14: Rota sintética para obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos.	34
Figura 15: Estrutura padrão para identificação dos átomos de carbono e hidrogênio utilizados na interpretação dos espectros de RMN ¹³ C e RMN ¹ H.....	35
Figura 16: Procedimento adotado para obtenção das concentrações utilizadas nos ensaios de determinação da atividade biológica frente ao <i>T. cruzi</i>	37
Figura 17: Ilustração da caixa de cubetas e procedimentos adotados para realização dos ensaios de determinação da atividade anti- <i>T. cruzi</i>	39
Figura 18: Diagrama de Craig apresentando a dispersão dos substituintes obtidos.	60
Figura 19: Etapa de obtenção das bases de Schiff substituídas.....	61
Figura 20: Mecanismos proposto para formação das bases de Schiff substituídas.....	61

Figura 21: Etapa de obtenção dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos	62
Figura 22: Mecanismo de ciclização oxidativa.....	63
Figura 23: Mecanismo para formação do grupo acetoxi.....	64
Figura 24: Placa cromatográfica revelada com luz ultravioleta.....	65
Figura 25: Espectro de RMN ¹ H indicando os principais sinais para a identificação dos compostos da série 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-metoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	67
Figura 26: Espectro de RMN ¹³ C indicando os principais sinais para a identificação da 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-iodo]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	68
Figura 27: Gráfico que apresenta a comparação dos valores de IC ₅₀ de todos os substituintes da série com o benznidazol (BZD).....	70
Figura 28: Gráfico de dispersão da atividade anti- <i>T. cruzi</i> correlacionando potência <i>versus</i> compostos avaliados.....	71
Figura 29: Gráfico de relação da atividade prevista <i>versus</i> atividade observada.....	73
Figura 30: Gráfico de resíduo <i>versus</i> atividade observada.....	73
Figura 31: Gráfico de resíduo <i>versus</i> atividade prevista.....	74
Figura 32: Gráfico de relação da atividade prevista <i>versus</i> atividade observada referente à equação 15b.....	75
Figura 33: Gráfico de resíduo <i>versus</i> atividade observada referente à equação 15b.....	75
Figura 34: Gráfico de resíduo <i>versus</i> atividade prevista referente à equação 15b.....	76
Figura 35: Gráfico de relação da atividade prevista <i>versus</i> atividade observada referente à equação 15c.....	76
Figura 36: Gráfico de resíduo <i>versus</i> atividade observada referente à equação 15c.....	77
Figura 37: Gráfico de resíduo <i>versus</i> atividade prevista referente à equação 15c.....	77
Figura 38: Esquema apresentando as etapas para a obtenção do modelo parabólico que correlaciona a atividade anti- <i>T. cruzi</i> com os descritores físico-químicos, π e \mathfrak{R} , para a série 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dose pediátrica e para indivíduos adultos dos fármacos utilizados para tratamento da tripanossomíase americana	9
Tabela 2: Resultados e condições reacionais envolvidas na obtenção das bases de Schiff	42
Tabela 3: Resultados e condições reacionais envolvidas na obtenção dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos	43
Tabela 4: Principais sinais de RMN ¹ H em DMSO - d ₆ (ppm) para a série 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.	44
Tabela 5: Principais sinais de RMN ¹³ C em DMSO - d ₆ (ppm) para a série 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.	45
Tabela 6: Análise Elementar CHN de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos	46
Tabela 7: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-iodo]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	48
Tabela 8: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-bromo]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	48
Tabela 9: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-cloro]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	49
Tabela 10: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-ciano]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	49
Tabela 11: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-etoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	50
Tabela 12: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-butoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	50
Tabela 13: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-etil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	51
Tabela 14: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-propil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	51
Tabela 15: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-nitro]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	52
Tabela 16: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-acetoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	52
Tabela 17: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-metoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	53

Tabela 18: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]- 3-acetil-5-[4-fenil-propoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	53
Tabela 19: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]- 3-acetil-5-[4-fenil-triflúormetil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas	54
Tabela 20: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]- 3-acetil-5-[4-fenil-hidrogênio]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	54
Tabela 21: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]- 3-acetil-5-[4-fenil-metil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.....	55
Tabela 22: Curva dose resposta para o fármaco utilizado como padrão.	55
Tabela 23: Avaliação da atividade anti- <i>T. cruzi</i> 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.	56
Tabela 24: Atividade anti- <i>T. cruzi</i> e descritores estruturais relacionados aos efeitos hidrofóbicos, eletrônicos e estereoquímicos de grupos substituintes utilizados na análise de QSAR-2D da série de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos	58
Tabela 25: Matriz de correlação dos descritores utilizados nos estudos de QSAR	59
Tabela 26: Comparação dos valores de desvio (Δ) obtidos para o substituinte ciano.....	69

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

DMF: dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DMSO-*d*₆: dimetilsulfóxido delterado

IC₅₀: concentração responsável por inibir 50% dos parasitas

L, B₁, B₂, B₃, B₄ e B₅: parâmetros estéricos definido pelo *Sterimol Program*

LIT: *Liver Infusion Tryptose*

Log 1/C: potência da atividade anti-*T. cruzi*

MR: refratividade molecular

NCE: *New Chemistry Entities*

P: coeficiente de partição

QSAR: *Quantitative Structure Activity Relationship*

RMN ¹³C: ressonância magnética nuclear de carbono

RMN ¹H: ressonância magnética nuclear de próton

TMS: tetrametilsilano

π: constante de hidrofobicidade de Hansch

ρ: constante da reação

σ: constante de grupo de Hammett

Σ: constante de campo de Swain e Lupton

ℳ: constante de ressonância de Swain e Lupton

Oliveira, A. A. **Planejamento, síntese, determinação da atividade biológica e estudos de QSAR-2D de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos frente ao *Trypanosoma cruzi***. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. São Paulo, 113 p. 2011.

RESUMO

Doenças como malária, esquistossomose, filaríase linfática, dengue, leishmaniose e mal de Chagas são endêmicas em países tropicais. Referente ao período entre 1975 e 2004, apenas 1% dos 1.556 novos fármacos registrados foi destinado ao tratamento destas doenças. Somente a doença de Chagas possui aproximadamente 18 milhões de casos em todo mundo. Até o momento, a quimioterapia para o tratamento dessa antropozoonose constitui-se basicamente de dois fármacos, o nifurtimox, proscrito no Brasil, e o benznidazol. Estes fármacos, além de apresentarem vários efeitos colaterais, são pouco eficazes, o que dificulta a adesão dos pacientes ao tratamento. Diante da necessidade imediata de novos fármacos para o combate de tripanossomíase americana, estratégias de modificação molecular têm se mostrado como ferramenta promissora para obtenção de novos fármacos, geralmente inspirados na estrutura molecular de fármacos já conhecidos. A estratégia de modificação molecular permite aumentar as chances de sucesso no processo de descoberta de novos fármacos, reduzindo tempo e custo da pesquisa. Este trabalho teve como objetivo o planejamento, a síntese e a avaliação da atividade anti-*T. cruzi* e a identificação das propriedades físico-químicas que são responsáveis por modular a atividade anti-*T. cruzi* da série dos 2-[5-nitrotiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas, compostos com estrutura análoga à nifuroxazida, fármaco antimicrobiano que também apresenta atividade antiparasitária. O planejamento da série de compostos estudados foi realizado com base no diagrama de Craig. A obtenção dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos foi realizada em quatro etapas sintéticas: esterificação, amonólise, obtenção da base de Schiff e ciclização oxidativa. As estruturas planejadas foram confirmadas por RMN ¹H e RMN ¹³C, enquanto a pureza foi avaliada pela faixa de fusão e de análise elementar de CHN. A atividade antiparasitária dos compostos foi determinada frente à cepa Y da forma epimastigota do *T. cruzi* e a concentração de parasitas foi quantificada através da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis ($\lambda = 580$ nm). Os quinze compostos da série foram avaliados em 6 diferentes concentrações (3,75; 5; 7,5 ; 10; 15; 20 μ M), sendo que somente o **etoxi-derivado** não foi mais ativo que o fármaco padrão, o benznidazol. Entre os compostos analisados identificaram-se o mais e o menos ativo da série, respectivamente: o 2-[5-nitrotiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4 fenil-**acetoxi**]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas ($IC_{50}=7,91$ μ M) e o 2-[5-nitrotiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4 fenil-**etoxi**]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas ($IC_{50}=26,60$ μ M). Através de estudos de QSAR-2D, a atividade anti-*T. cruzi* foi correlacionada com descritores físico-químicos, como a hidrofobicidade, os efeitos eletrônicos e o volume molecular. Com a aplicação de modelos matemáticos, ficou evidenciado que a atividade anti-*T. cruzi* desta série de compostos sofre notável influência da hidrofobicidade e dos efeitos eletrônico de ressonância, o que permite a continuidade deste trabalho através da variação planejada destas propriedades, visando identificar o análogo mais potente da série de compostos estudados.

Palavras chave: química medicinal, planejamento de fármacos, QSAR-2D, análogos da nifuroxazida, derivados 1,3,4-oxadiazolínicos, atividade anti-*T. cruzi*.

ABSTRACT

Oliveira, A. A. **Design, synthesis, determination of biological activity and QSAR-2D studies of 1,3,4-oxadiazoles derivatives against *Trypanosoma cruzi***. Dissertation - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. São Paulo, 113 p. 2011.

Diseases like malaria, schistosomiasis, lymphatic filariasis, dengue, leishmaniasis and Chagas' disease are endemic in tropical countries. From 1975 to 2004, only 1% of 1.556 new drugs were registered for the treatment of these diseases. Chagas disease itself has approximately 18 million of cases worldwide, and the chemotherapy for the treatment of this anthrozoosis consists basically of two drugs, nifurtimox, which is prohibited in Brazil, and benznidazole. These drugs have various side effects and can also be ineffective, making patients give up the treatment. Given the immediate need for new drugs to treat american trypanosomiasis, molecular modification strategies have been shown as a promising tool for obtaining new drugs, often inspired by the molecular structure of known drugs. The strategy of molecular modification will increase the chances of success in the discovery process of new drugs, reducing the time and the costs of research. Given the situation above described, this work aims to design synthesis and evaluate the anti-*Trypanosoma cruzi* activity of new drugs as well as identification physicochemical properties that are responsible for modulating the anti-*T. cruzi* activity. Series of 2-[5-nitro-thiophen-2-yl]-3-acetyl-5-[4-phenyl-substituted]-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazolines, compounds with similar structure to nifuroxazide, an antimicrobial drug that also has antiparasitic activity. The planning of the series of compounds was carried out based on the Craig diagram. The obtainment of the 1,3,4-oxadiazolinic derivatives was performed with four synthetic steps, as follows: esterification, ammonolysis, obtention of the Schiff base and oxidative cyclization. The designed structures were confirmed by ^1H and ^{13}C NMR and purity was assessed by melting point and elemental analysis of CHN. The antiparasitic activity of compounds was determined against the Y strain of *T. cruzi* in the epimastigote form and the concentration of parasites was quantified by absorbance in a spectrophotometer UV / Vis ($\lambda = 580 \text{ nm}$). The fifteen compounds obtained were evaluated in six different concentrations (3.75, 5, 7.5, 10, 15, 20 μM), and only the ethoxy-derivative was less active than the standard drug, benznidazole. The 2-[5-nitro-thiophen-2-yl]-3-acetyl-5-[4-acetoxyphenyl]-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazolines ($\text{IC}_{50}=7.91 \mu\text{M}$) and of 2-[5-nitro-thiophen-2-yl]-3-acetyl-5-[4-etoxyphenyl]-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazolines ($\text{IC}_{50}=26.60 \mu\text{M}$) derivatives were identified as the most and the least active of the series, respectively. Through 2D-QSAR studies, the anti-*T. cruzi* activity was correlated with physicochemical descriptors such as hydrophobicity, molecular volume and electronic effects. Applying mathematical models, it became evident that the activity of anti-*T. cruzi* activity in this series of compounds undergoes remarkable influence of hydrophobicity and electronic effects of resonance, which allows the continuity of the work planned by varying these properties to identify the most potent analogue among the series of compounds studied.

Keywords: medicinal chemistry, drug design, QSAR-2D, nifuroxazide analogs, 1,3,4-oxadiazoline derivatives, anti-*T. cruzi* activity.

1 INTRODUÇÃO

O agente etiológico da tripanossomíase americana é o *Trypanosoma cruzi* e foi primariamente descrito pelo médico brasileiro Carlos Chagas, em 1909 (Chagas, 1909; Neves *et al.*, 2004). A transmissão vetorial desta enzoontia depende da presença de insetos dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (Neves *et al.*, 2004). Atualmente, 22 países localizados na América Latina são considerados como áreas endêmicas do mal de Chagas. Dentre os fatores que propiciaram condições adequadas para disseminação do protozoário, que ocorre principalmente pela via vetorial e transfusional, destacam-se o intenso êxodo rural que ocorreu na década de 1940, o desmatamento de zonas rurais e a falta de rigor na seleção de bolsas de sangue para transfusão. A associação desses fatores contribuiu para que esta patologia fosse considerada como uma das maiores causas de infecções parasitárias em todo mundo, ficando atrás somente da malária e da esquistomose (WHO, 2010; Gascon, Bern, Pinazo, 2009). Ademais, a doença de Chagas representa a primeira causa de lesões cardíacas em jovens que residem nos países endêmicos (Neves *et al.*, 2004).

O mal de Chagas é um notório problema de saúde pública de países da América Latina e, atualmente, vem sendo considerado como uma doença emergente em países da América do Norte e da Europa. Nas últimas três décadas, a migração de indivíduos assintomáticos de áreas rurais para grandes centros urbanos de diversos países mudou o perfil epidemiológico da doença, o que demonstra que o mal de Chagas adaptou-se facilmente à globalização (Gascon, Bern, Pinazo, 2009).

A doença tem duas fases: a fase aguda e a crônica. Aproximadamente a metade dos pacientes não chega a desenvolver os sintomas típicos da fase aguda, porém, esta fase pode perdurar por 6 a 8 semanas. Já a fase crônica da doença é definida como a forma indeterminada, já que a maioria dos pacientes permanece nesta fase sem apresentar sintomas durante muitos anos. Estudos apontam que cerca de 20 a 35% dos indivíduos acometidos desenvolvem lesões irreversíveis no sistema nervoso autônomo no coração, no esôfago e no intestino grosso (Neves *et al.*, 2004; Rey, 2008).

Mesmo com imenso impacto socioeconômico para os países endêmicos, o arsenal terapêutico à disposição para o combate do mal de Chagas consiste somente no uso de dois compostos nitro-heterocíclicos, o benznidazol e o nifurtimox (Urbina, Docampo, 2003; Andrade *et al.*, 1996). O tratamento incide basicamente na fase aguda, na qual a quimioterapia apresenta cura parasitológica em torno de 80% dos casos; porém, os longos períodos de tratamentos e os diversos efeitos colaterais tornam mais difícil a adesão dos pacientes (Bahia-

Oliveira *et al.*, 2000). Por outro lado, na fase crônica, estes fármacos apresentam apenas 5 a 20% de cura dos pacientes (Cançado, 2002; Dias, 2006), sendo que vários casos de resistência têm sido relatados. Não obstante, nota-se o profundo descaso com que esta questão vem sendo enfrentada pelos governos dos países acometidos e pela indústria farmacêutica (Urbina, Docampo, 2003).

Diante do exposto, a busca por novos fármacos mais eficazes e menos tóxicos para o combate da doença de Chagas é de extrema importância. Estratégias que envolvem a modificação estrutural de fármacos já consagrados na terapêutica mostram-se como ferramentas promissoras no que se refere à redução de custos e de tempo de pesquisa. As modificações estruturais podem alterar as propriedades físico-químicas, favorecendo à melhora da atividade biológica e auxiliando na elucidação dos mecanismos envolvidos na bioatividade. A nifuroxazida, fármaco antimicrobiano empregado na terapêutica, apresenta estrutura química propícia para o emprego de metodologias de modificação molecular, baixa toxicidade e baixa capacidade de indução de resistência bacteriana. Tais características denotam o potencial deste fármaco como composto líder. Assim, através da modificação da estrutura da nifuroxazida, este trabalho visa a obtenção dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos e a avaliação da atividade biológica frente ao *Trypanosoma cruzi*.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo identificar as propriedades físico-químicas responsáveis por modular a atividade anti-*T. cruzi* para série de 2-[5-nitro-tiofen-2il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituídas]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas, compostos com estrutura análogas à nifuroxazida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Planejamento, síntese e identificação de série de 2-[5-nitro-tiofen-2il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituídas]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.
- ✓ Avaliação da atividade biológica frente ao *T. cruzi*.
- ✓ Estudo da relação estrutura-atividade, através da aplicação de modelos matemáticos que correlacionem parâmetros físico-químicos com a atividade biológica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DOENÇA DE CHAGAS

3.1.1 APECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Estima-se que aproximadamente 1 bilhão de pessoas em todo mundo, ou seja, 1/6 da população mundial, está diagnosticada com algum tipo de doença tropical (WHO, 2004, Remme *et al.*, 2002). Doenças tropicais são patologias que não possuem tratamento adequado e incidem principalmente em países subdesenvolvidos, mormente países da América Latina e do continente africano, que recebem pequenas ou quase nenhuma atenção internacional. Incluem-se nesse grupo as seguintes infecções: malária, filariose, esquistossomose, doença do sono, dengue, leishmaniose, hanseníase, oncocercose, ascariíase, tricuriíase, tracoma e doença de Chagas, que somadas chegam a valores estimados entre 137 mil a 534 mil mortes por ano (WHO, 2004).

Dados divulgados pelo *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (DNDi, 2010) relatam que apenas 1% dos 1.556 novos fármacos registrados entre 1975 e 2004 foram desenvolvidos especificamente para doenças tropicais. Em relação a todos os investimentos destinados ao combate das doenças tropicais, apenas 5% foram reservados ao controle e ao tratamento de doenças como leishmaniose visceral, doença de sono e tripanossomíase americana, o que sugere que maior negligência ocorre com estas doenças.

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma zoonose ou antropozoonose causada pelo protozoário flagelado *T. cruzi* (Neves *et al.*, 2004; Rey, 2008). A tripanossomíase americana estende-se do sul dos Estados Unidos até Argentina e Chile, com forte incidência no Brasil (Ancizu *et al.*, 2009). Na América Latina, há cerca de 100 milhões de pessoas vivendo em moradias alocadas em áreas endêmicas, sob o alto risco de contaminação. Estima-se que haja aproximadamente 20 milhões de pessoas infectadas, 200.000 novos casos e mais de 21.000 óbitos por ano referentes ao mal de Chagas (WHO, 2009).

Medidas profiláticas efetivas foram adotadas para o combate à transmissão vetorial desta doença. O Uruguai, em 1997, foi o primeiro país do Cone Sul a conseguir interromper as transmissões vetoriais e por transfusão sanguínea. Em 1999, foi a vez de países como Chile, Bolívia, Paraguai e grande parte da Argentina. O Brasil somente conseguiu o mesmo feito em 2006. Grandes avanços no combate da transmissão vetorial foram obtidos, porém a completa erradicação da tripanossomíase está longe de ser alcançada. Atualmente, existem

milhares de indivíduos portadores do mal de Chagas que não dispõem de tratamentos adequados, que nem se quer foram diagnosticados e, assim, acabam por contribuir no processo de disseminação desta patologia (Sobrinho *et al.*, 2007).

Além dos países latino-americanos, a doença de Chagas está presente em outros continentes. As facilidades de traslado e os intensos movimentos migratórios, característicos do mundo globalizado, possibilitam a instalação de focos da doença por diversos países. Onde não há presença do vetor, a transfusão sanguínea torna-se a principal via de transmissão. Há casos registrados em diversos países, entre eles: Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália, Bélgica, França, Espanha, Itália, Suíça e Croácia; com aproximadamente 300 mil indivíduos infectados nos Estados Unidos, 5.500 no Canadá, 80.000 na Europa, 3.000 no Japão e 1.500 na Austrália (Coura, Viñas, 2010). A figura 1 apresenta o perfil epidemiológico da doença de Chagas em países endêmicos e não endêmicos.

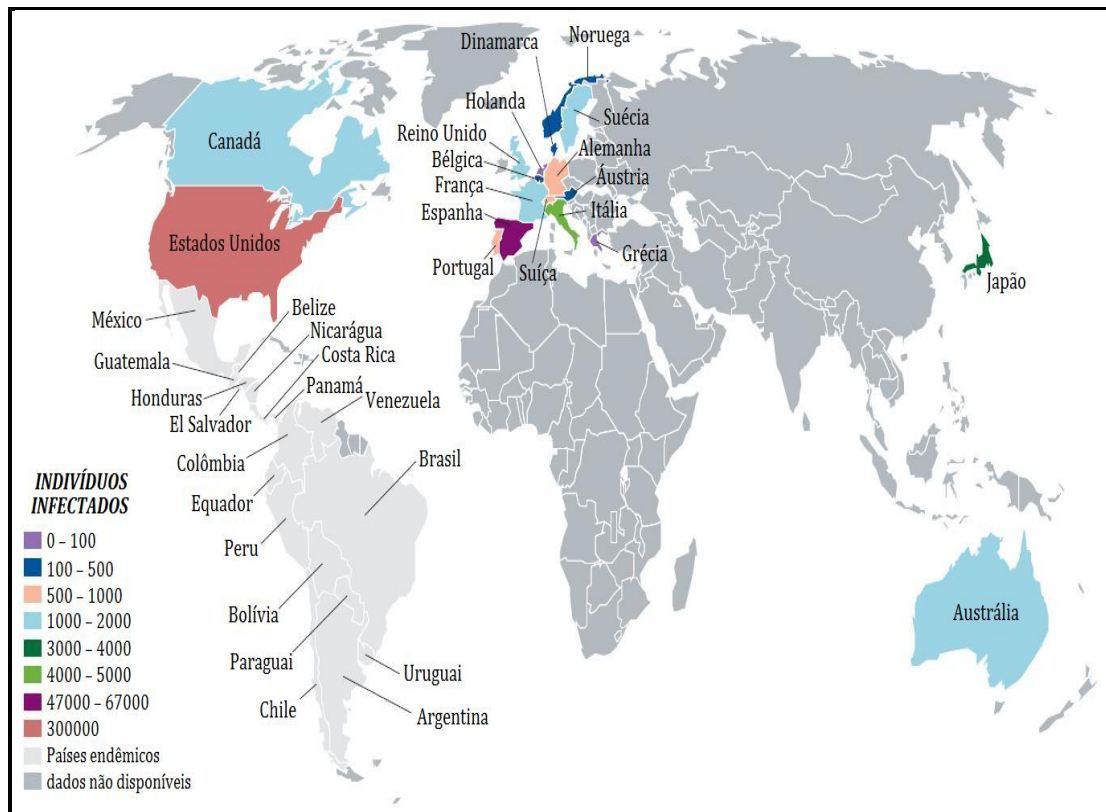


Figura 1: Casos notificados da doença de Chagas em regiões endêmicas e não endêmicas (Coura, Viñas, 2010).

A tripanossomíase americana é umas das principais responsáveis por causar morte súbita dos pacientes acometidos, estando muitas vezes os pacientes na fase de vida mais produtiva.

3.1.2 CICLO EVOLUTIVO

O ciclo biológico do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico (existência de hospedeiro vertebrado e invertebrado), passando o parasito por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (mamíferos pertencentes a sete classes taxonômicas diferentes) e extracelular no hospedeiro invertebrado (triatomíneo). O ciclo biológico do *T. cruzi* pode ser dividido em 8 etapas, como ilustra a figura 2. As formas amastigotas e tripomastigotas são responsáveis por desenvolver a infecção no ser humano e em mamíferos. As formas tripomastigotas eliminadas nas fezes e urina do vetor, durante ou logo após o repasto sanguíneo (1), penetram pelo local da picada e interagem com células do sistema monocítico fagocitário (2) da pele ou mucosas do ser humano. Os tripomastigotas invadem as células e transformam-se em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária (3). Os amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas (4), que são liberados na corrente sanguínea do hospedeiro e migram para outras células de outros tecidos para realizar novo ciclo celular. Presentes na corrente circulatória, os tripomastigotas podem ser ingeridos por outros triatomíneos (5), quando ocorrerá o ciclo extracelular. Nos triatomíneos, os tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas no trato digestivo (6), no qual se multiplicam (7). No reto, porção final do trato digestivo, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas (8), que serão eliminados nas fezes e urina, aptas a infectar novos hospedeiros vertebrados, fechando o ciclo (Neves *et al.*, 2004; Rey, 2008; Gilles, 1999).

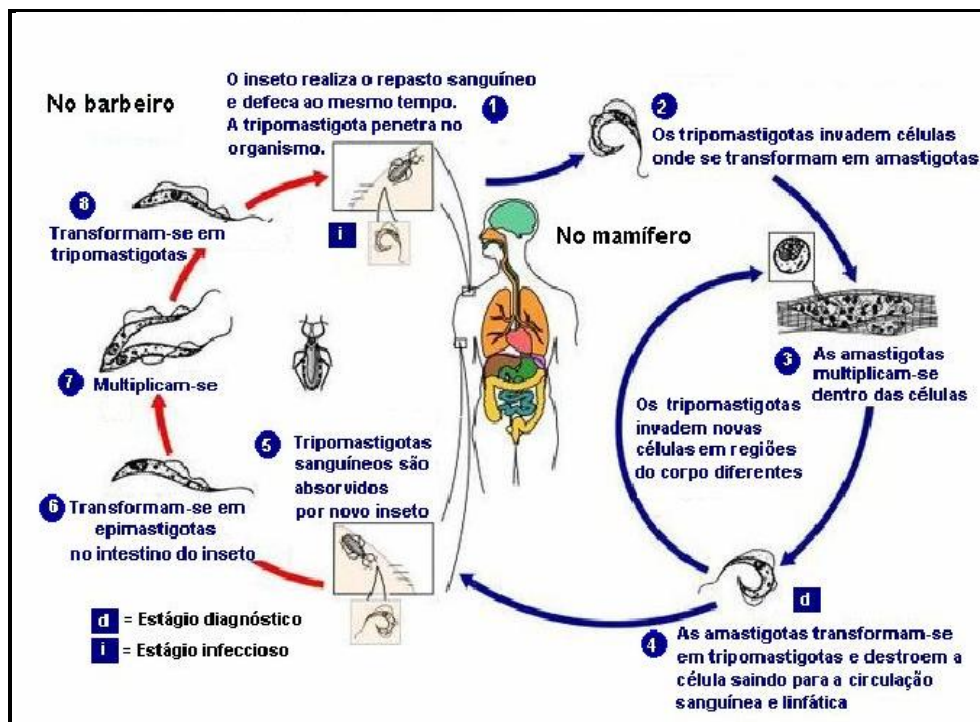


Figura 2: Ciclo biológico do *T. cruzi* (CDC, 2010).

O ciclo do protozoário na natureza está associado com mais de 100 espécies de mamíferos silvestres, que participam como reservatórios de *T. cruzi*, e 150 espécies de triatomíneos, que atuam como vetores biológicos do agente etiológico (Coura, Viñas, 2010; Gilles, 1999). Os vetores de relevância epidemiológica para disseminação da antropozoonose são da ordem *Hemiptera*; família *Reduviidae*; dos gêneros: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. O vetor habita frestas nas paredes das cafuas (moradias construídas de barro ou madeira), onde fica abrigado durante o dia e sai à noite para fazer o repasto sanguíneo em humanos e animais, nas regiões domiciliares e peridomiciliares (Neves *et al.*, 2004; Rey, 2008, Gilles, 1999).

Nem todos os indivíduos infectados apresentam sintomatologia clínica característica. Muitos pacientes, depois da fase aguda, permanecem como assintomáticos da infecção; outros, porém, desenvolvem lesões graves e progressivas que conduzem à cardiopatia chagásica, ao megaloesôfago, ao megacólon e a outras formas da doença. Na fase aguda (fase em que 5% das crianças acometidas vão a óbito) as manifestações mais comuns são febre, edema facial, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Os sintomas da fase aguda geralmente desaparecem espontaneamente entre quatro e seis semanas. Após este estágio, os pacientes poderão entrar na fase assintomática, na qual poderão permanecer 10 anos ou mais sem apresentar nenhuma complicação clínica. Na fase crônica, cerca de 20 a 35% dos pacientes infectados desenvolvem problemas relacionados ao sistema cardiocirculatório e os óbitos geralmente ocorrem por arritmias ou insuficiência cardíaca congestiva (Croft *et al.*, 2005; Urbina, 1999).

3.1.3 TRATAMENTO

Apenas dois fármacos estão disponíveis para o tratamento da doença de Chagas: benznidazol e nifurtimox, este proscrito no Brasil, mas utilizado em alguns países da América Latina. O nifurtimox é pertencente à classe dos nitrofuranos, enquanto o benznidazol é um fármaco nitroimidazólico; ambos apresentam o grupo nitro em suas estruturas (figura 3) e suas atividades estão relacionadas com a presença desse grupo na molécula (Pereira *et al.*, 2009).

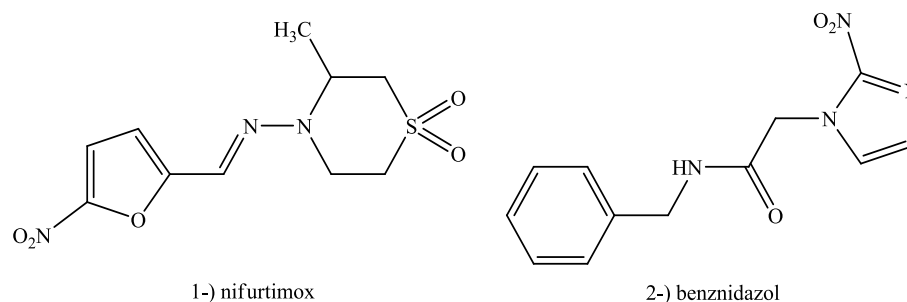


Figura 3: Estrutura de fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas.

Estes fármacos nitro-heterocíclicos foram introduzidos na terapêutica na década de 1970 para o tratamento da doença de Chagas, porém, apresentam baixas taxas de cura na fase crônica e moderadas taxas na fase aguda, apresentando de 5 a 20% de eficácia na fase crônica e cerca de 80% na fase aguda da infecção. A eficácia desses fármacos pode variar de acordo com a área geográfica, provavelmente em consequências das diferenças de susceptibilidade das cepas existentes do *T. cruzi* (Fries, Fairlamb, 1998).

A doença de Chagas se caracteriza pela sua variedade nas apresentações clínicas, que incluem a forma indeterminada, a cardiomiopatia e as alterações digestivas (Prata, 1985). Variações intraespecíficas nas diferentes cepas do *T. cruzi* têm sido demonstradas tanto em nível morfológico, quanto bioquímico e genético (Andrade, 1974, 1985; Miles *et al.*, 1977; Morel *et al.*, 1980; Steindel *et al.*, 1983). Através dessas caracterizações morfológica, bioquímica e genética, foi possível agrupar as cepas do *T. cruzi* em 3 biodemas ou tipos: I, II e III. O biodema I, cujo protótipo é a cepa Y, é constituído por cepas com predomínio de formas delgadas e que apresentam macrofagotropismo na fase inicial da infecção e de rápida proliferação. O biodema II possui como protótipo a cepa São Felipe, que tem predominância de formas largas, de lenta multiplicação e com miocardiotropismo. Por último, o biodema III tem como protótipo a cepa Colombiana, que apresenta formas largas, de baixa multiplicação, com tropismos pela musculatura esquelética (Andrade, 1974, 1985; Andrade, Magalhães, 1997; Devera *et al.*, 2002). Em uma determinada área geográfica pode estar presente um ou vários biodemas do *T. cruzi*, porém, geralmente há predomínio de um deles, o que se reflete nas diversas respostas clínicas ao tratamento.

O uso do nifurtimox e do benznidazol na terapêutica consiste em tratamentos prolongados, que dificultam a adesão dos pacientes, visto que os pacientes relatam inúmeros efeitos colaterais, tais como náuseas, vômitos, dores abdominais, anorexia, perda de peso, dermatites, febre, icterícia e até mesmo choque anafilático. A tabela 1 apresenta as doses diárias para adultos e crianças e o tempo estimado para o tratamento completo.

Tabela 1: Dose pediátrica e para indivíduos adultos dos fármacos utilizados para tratamento da tripanossomíase americana (Fries, Fairlamb, 1998)

Fármaco	Dose para Adultos	Dose Pediátrica
nifurtimox	8-10 mg/kg/dia ^a	1-10 anos – 15-20 mg/kg/dia ^a
		11-16 anos – 12,5–15 mg/kg/dia ^a
benznidazol	5-7 mg/kg/dia ^b	1-12 anos – 10 mg/kg/dia ^b

a : Tratamento dividido em quatro doses diárias por 90 a 120 dias.

b: Tratamento dividido em duas doses diárias por 30 a 90 dias.

O mecanismo de ação desses fármacos não está totalmente esclarecido, porém, para o nifurtimox, acredita-se que este ocorra por processo de biorredução enzimática do grupo nitro (ver item 3.6). A passagem transmembrana deste fármaco ocorre por difusão passiva e aumenta à medida que radicais livres provenientes do processo de biorredução desestabilizam a membrana celular. Desta forma, o aumento da concentração intracelular de nitrocompostos gera maior quantidade de radicais livres que, por sua vez, aumenta os danos causados pelo estresse oxidativo (Viodé *et al.*, 1999; Maya *et al.*, 2007; Edward, 1986; Kappus, 1986). O benznidazol parece atuar por estresse redutivo, no qual envolve modificações covalentes de macromoléculas, devido à ação de intermediários provenientes da redução do grupo nitro (Docampo, 1990; Sobrinho *et al.*, 2007).

3.2 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

O processo de desenvolvimento de novos fármacos é oneroso e envolve cerca de 10 a 15 anos de pesquisa e desenvolvimento (P&D) até a finalização do projeto. Estima-se que, para o projeto de um novo fármaco, investimentos acima de 1 bilhão de dólares podem ser alcançados. Os altos investimentos se justificam devido ao baixo percentual de sucesso nas etapas do processo, tendo em vista que cerca de 1 em cada 10 novas entidades químicas (*New Chemistry Entities* - NCE) que chegam à avaliação clínica, conseguem alcançar a etapa de comercialização. Assim, o desenvolvimento de metodologias com melhores capacidades preditivas e que permitam triar grande número de compostos faz-se necessárias para reduzir os custos e aumentar as possibilidades de êxito do processo (Lombardino, Lowe, 2004; Dimasi, Hansen, Grabowsky, 2003; United States Government Accountability Office, 2006; Dickson, Gagnon, 2004).

A introdução de um novo fármaco no mercado não depende somente de necessidades médicas. O fator que propulsiona a indústria farmacêutica a introduzir um produto inovador no mercado restringe-se, em grande parte, a lucros. O foco das indústrias farmacêuticas está na busca por fármacos para o tratamento de depressão, úlcera, resfriado, enxaquecas, obesidade, câncer e doenças cardiovasculares, visto que o retorno financeiro para estas doenças é muito maior (Kaba *et al.*, 1998).

Doenças tropicais ou negligenciadas ainda permanecem longe do interesse das indústrias farmacêuticas, já que as etapas para o desenvolvimento de um novo fármaco para tal finalidade exigem altos investimentos e o retorno financeiro não é compatível com esses investimentos. Os estágios de planejamento e desenvolvimento de fármacos são basicamente três, a saber: descobrimento, fases pré-clínica e clínica. Inserida na etapa clínica está a farmacovigilância, que se baseia na constante observação dos efeitos colaterais e das reações adversas a que um fármaco é submetido, mesmo após sua liberação para comercialização (Kaba *et al.*, 1998; United States Government Accountability Office, 2006). A figura 4 ilustra os estágios de desenvolvimento de novos fármacos

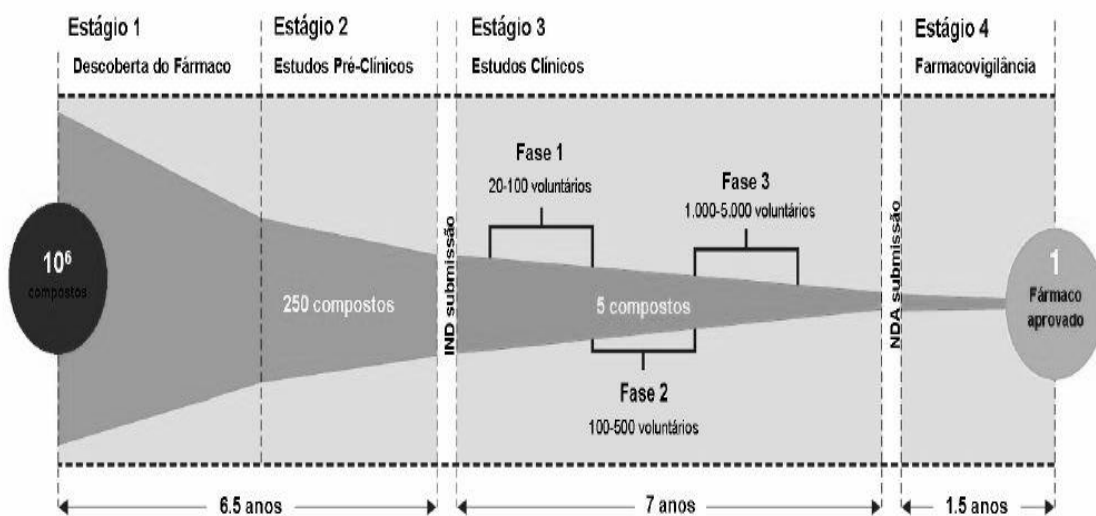


Figura 4: Estágios para o planejamento e o desenvolvimento de novos fármacos (United States Government Accountability Office, 2006).

O estágio de descobrimento de fármacos envolve a seleção do alvo terapêutico em uma dada patologia de interesse. Uma análise detalhada do alvo terapêutico selecionado permitirá identificar se o ligante planejado será um agonista ou antagonista de um determinado receptor ou se um inibidor enzimático deverá ser planejado para uma enzima de

interesse (Guido, 2008). No planejamento racional de fármacos é crucial a escolha de alvos que sejam seletivos. Quanto mais seletivo é o alvo escolhido, menores são as possibilidades de interação com outros alvos e, assim, menores possibilidades de efeitos colaterais. Para fármacos com atividade antimicrobiana e antiparasitária, os melhores alvos são estruturas ou enzimas que sejam exclusivas dos microrganismos em estudo. Assim, a elaboração de ensaios biológicos adequados para avaliar a real interação entre fármaco e alvo é fundamental para que se tenha êxito no processo (Michael, Mehlin, Triggle, 1998).

Após determinado o alvo terapêutico, pesquisadores procuram identificar novas NCE capazes de interagir com o alvo selecionado e, assim, modular a resposta fisiopatológica. A utilização de dispositivos automatizados, ou ensaios biológicos miniaturizados (*High Throughput Screening*, HTS), permitiu maior agilidade no processo de seleção de substâncias bioativas (Dias, Corrêa, 2001). Os ligantes ou substâncias bioativas (*hits*) podem ser provenientes de produtos vegetais, animais, humanos, biotecnológicos ou síntese química.

Estas moléculas podem ser selecionadas por triagens virtuais ou experimentais, contanto que todas as moléculas triadas virtualmente tenham suas atividades biológicas experimentais avaliadas. Nesta etapa, muitas moléculas que não têm perfil farmacológico adequado (como, por exemplo: baixa potência, pouca seletividade, alta toxicidade) e que precisam ser otimizadas, são identificadas. Os compostos bioativos que apresentam as propriedades físico-químicas mais adequadas, frente a determinado alvo, são definidos como compostos líderes (*lead compounds*) (Patrick, 2009).

Compostos líderes podem ser isolados da natureza com propriedades farmacológicas e toxicológicas que justifiquem seu uso como fármacos, sem nenhuma modificação molecular prévia, como, por exemplo: morfina, quinina e paclitaxel. Entretanto, a grande maioria dos compostos líderes apresenta baixa eficácia e efeitos colaterais inaceitáveis para ser empregados como fármacos, sendo necessário realizar algum tipo de modificação estrutural (Barreiro, Fraga, 2001).

O processo de otimização de fármacos envolve a modificação da estrutura precursora para aumentar a potência e a seletividade e para diminuir a toxicidade dos compostos, ou seja, melhorar as características farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Para tal finalidade, pode-se fazer uso de estratégias de planejamento molecular clássicas, como bioisosterismo, homologia, simplificação e hibridação molecular (Barreiro, Fraga, 2001). Tais estratégias, aliadas ao emprego de técnicas computacionais, como modelagem molecular e QSAR (*Quantitative Structure - Activity Relationship*), auxiliam a melhor compreensão dos grupos farmacofóricos, a conformação bioativa e a identificação do índice de reconhecimento

molecular do ligante pelo alvo selecionado (Lima, 2007). O uso do QSAR como ferramenta para descoberta de novos fármacos auxilia no direcionamento da síntese dos análogos mais ativos, minimizando o universo de compostos a serem considerados nos programas de triagem biológica e, assim, reduzindo os custos e o tempo em P&D (Patrick, 2009).

Além do QSAR, abordagens como a triagem virtual (*virtual screening*) também são utilizadas para reduzir o universo de compostos a serem avaliados. O princípio da triagem virtual baseia-se na seleção dos compostos que apresentem propriedades físico-químicas mais adequadas ao modelo computacional, para depois ser avaliadas experimentalmente e, assim, aumentar as chances de selecionar compostos bioativos para prosseguir com as próximas etapas do processo (United States Government Accountability Office, 2006; Lima, 2007).

Já na etapa pré-clínica, os compostos líderes são avaliados *in vivo* e *in vitro*, para prever se algumas das NCE são seguras para o uso em humanos. Para isto, ensaios farmacológicos (farmacocinéticos e farmacodinâmicos), toxicológicos (genotoxicidade) e determinação dos potenciais carcinogênicos e mutagênicos são efetuados. A grande maioria dos compostos falha nas duas primeiras etapas do processo (em média, somente 5 de 10.000 compostos avaliados completam essas duas fases iniciais com sucesso). Aproximadamente, a duração da fase de descobrimento, somada à fase pré-clínica, oscila entre seis a sete anos (United States Government Accountability Office, 2006).

Caso o composto seja promissor, o processo será encaminhado às agências regulamentadoras do país onde estiverem sendo conduzidos os estudos, para que seja iniciada a etapa de estudos clínicos. Após a averiguação do órgão regulamentador de que os voluntários não serão expostos a riscos consideráveis que possam trazer algum tipo de seqüela, esta etapa pode ser iniciada (United States Government Accountability Office, 2006; Kaba *et al.*, 1998).

A triagem clínica divide-se em três fases. A primeira fase é constituída de estudos dirigidos para avaliar os efeitos tóxicos dos candidatos a fármaco em um grupo de 20 a 100 indivíduos. Efeitos colaterais são identificados e várias posologias são avaliadas. Na segunda fase, o candidato é avaliado em um grupo de aproximadamente 100 a 500 indivíduos, que são diagnosticados com a doença em foco no estudo, de modo a avaliar a eficácia e a segurança. A terceira fase consiste em análise mais ampla, em um grupo de 1.000 a 5.000 voluntários, para avaliar a absorção, a distribuição, o metabolismo, a excreção e a toxicidade. Para que as etapas da fase clínica possam estar devidamente concluídas são necessários cerca de 7 anos. Todas as etapas do processo encontram-se resumidas na figura 5 (Lombardino, Lowe, 2004; United States Government Accountability Office, 2006; Patrick, 2009).

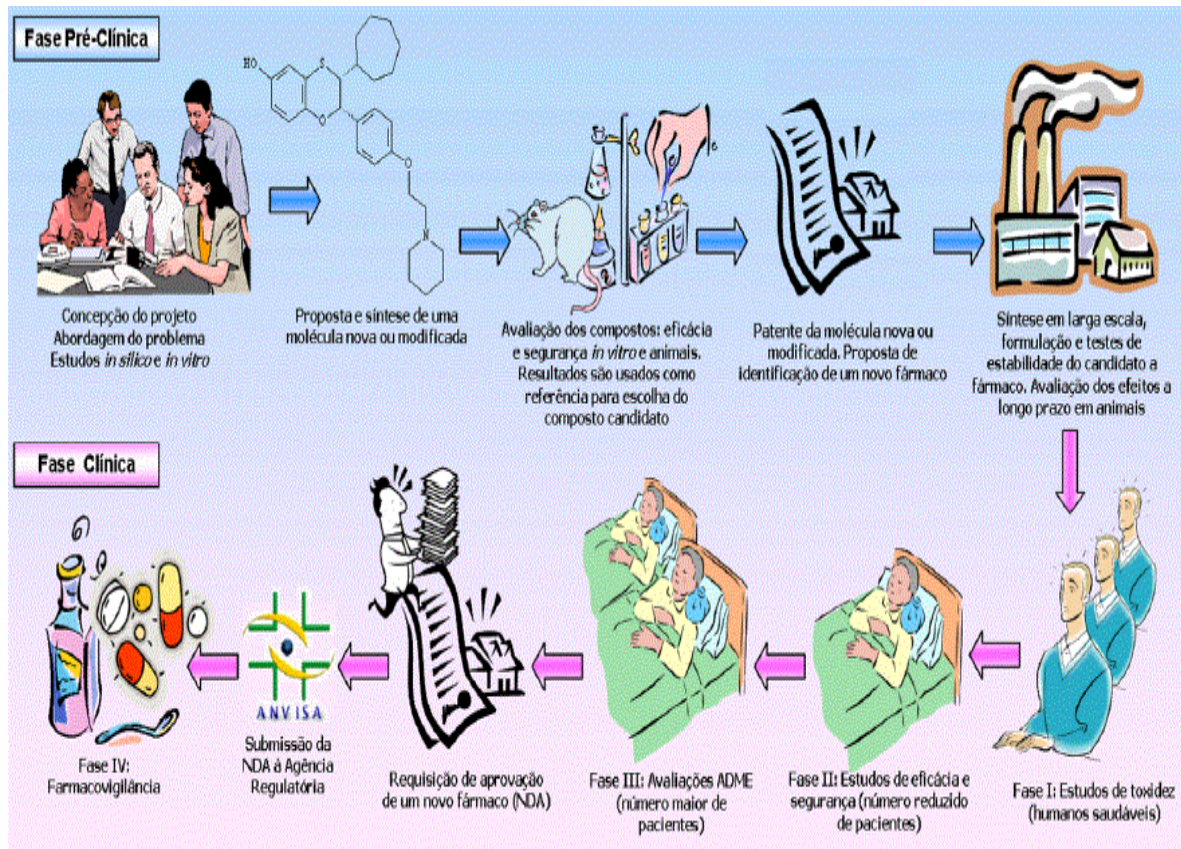


Figura 5: Etapas do processo de desenvolvimento de novos fármacos (Lombardino, Lowe, 2004; Salum, 2004).

Assim que são finalizados os estudos clínicos, a entrada no mercado da NCE depende de nova avaliação das agências reguladoras, que irão rever todas as etapas do processo de triagem clínica e concluir se o candidato a fármaco é seguro e eficaz para ser destinado ao tratamento de determinada patologia (Kaba *et al.*, 1998).

3.3 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DETERMINANTES PARA AÇÃO DE FÁRMACOS

A ação terapêutica de fármacos resulta de interações destes com sistemas biológicos e é dependente de fatores relacionados com sua estrutura química e, conseqüentemente, com suas propriedades físico-químicas. As propriedades físico-químicas de maior importância para que um fármaco apresente atividade biológica são as que envolvem aspectos hidrofóbicos, eletrônicos e estereoquímicos. Cada uma destas propriedades pode ser descrita por diversos parâmetros (Tavares, 1993).

No processo de planejamento de desenvolvimento de novos fármacos, é necessário ponderar aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, pois, caso uma dada molécula

bioativa não seja capaz de ser absorvida, nada adiantará que ela apresente perfeita complementaridade com o alvo de estudo. A modificação de uma determinada molécula implica em alterações nas propriedades físico-químicas, sendo que estas podem ser expressas através de parâmetros. Assim, correlacionar a influência de parâmetros físico-químicos, principalmente os que expressam hidrofobicidade, com a atividade biológica é crucial para a identificação de moléculas bioativas que apresentem perfil farmacológico promissor (Kubinyi, 1993, 1979; Wermuth, 2003).

3.3.1 HIDROFOBICIDADE

A membrana plasmática é uma barreira biológica, que possui como principal função separar o citoplasma do meio extracelular. Há inúmeras moléculas, como mediadores químicos, aminoácidos, gases, peptídeos, íons, carboidratos e outras, que transpassam a membrana com intuito de suprir as necessidades metabólicas da célula. Em contrapartida, várias moléculas, que são produzidas no meio intracelular, são excretadas ou secretadas para o meio extracelular. Foi com o intuito de compreender por que substâncias com características díspares têm a capacidade de transpassar este obstáculo que Singer e Nicholson, em 1972, propuseram o modelo de membrana plasmática mais aceito para explicar os fenômenos que envolvem o processo de absorção de biomoléculas (Junqueira, Carneiro, 2008; Guyton, Hall, 1997).

Segundo este modelo, a membrana plasmática é uma bicamada lipídica que apresenta uma região interior hidrofóbica e, na extremidade, grupos fosfatos, que conferem características hidrofílicas à membrana. Além disso, sua composição conta com proteínas (integrals e periféricas), glicídios e lipídios que participam no mecanismo de absorção de biomoléculas. A figura 6 ilustra o modelo do mosaico fluido proposto por Singer e Nicholson (Junqueira, Carneiro, 2008; Guyton, Hall, 1997).

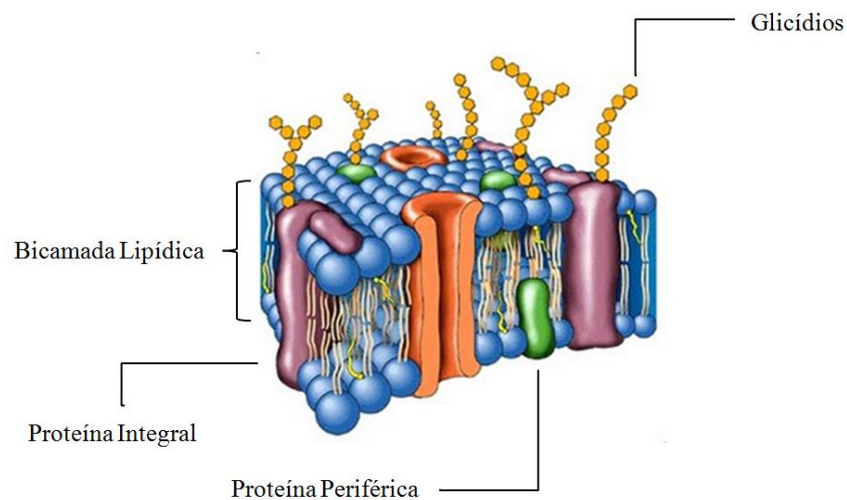


Figura 6: Modelo do mosaico fluido proposto por Singer e Nicholson em 1972.

Um fármaco, para ser absorvido pela membrana plasmática, não deverá ser extremamente hidrofóbico e nem extremamente hidrofílico e deve apresentar hidrofobicidade adequada para que possa ser absorvido. Em geral, os fármacos podem ser absorvidos basicamente por dois processos: paracelular ou transcelular (Swaan, 1998). No transporte paracelular, as moléculas movem-se através das junções intercelulares existentes entre as células adjacentes. Quanto ao transporte transcelular, este pode ser classificado de acordo com a natureza do transporte, que pode ser por difusão passiva ou ativa (mediada por transportadores). Na difusão passiva, o movimento das moléculas do fármaco é impelido pelo seu gradiente de concentração. No transporte ativo mediado por carreadores, a membrana apresenta receptores responsáveis por transportar moléculas contra o gradiente de concentração, usando, para isso, suplemento de energia proveniente da hidrólise da molécula de ATP, ou seja, com gasto de energia (Swaan, 1998; Guyton, Hall, 1997).

Para que um fármaco consiga alcançar o seu sítio de ação em concentrações adequadas, além de passar pela etapa de absorção, deve passar também pelas etapas de distribuição, biotransformação e excreção (Barreiro, Fraga, 2001). De modo geral, todas estas etapas estão vinculadas com o tamanho, a solubilidade, o grau de ionização (pKa) e a lipofilicidade (Log P) das formas ionizadas e não ionizadas da estrutura de um fármaco (Barreiro, Manssour, 2001; Silverman, 2004; Guyton, Hall, 1997).

Quanto ao grau de ionização, a grande maioria dos fármacos consiste de ácidos ou bases fracas que, quando em solução, apresentam equilíbrio entre as formas ionizadas e não ionizadas. As moléculas na forma não ionizada, pelo fato de serem mais hidrofóbicas, podem ser absorvidas por transporte passivo. Em contrapartida, moléculas ionizadas são transportadas através da membrana por transporte ativo, sendo seu transporte fortemente

influenciado pelo pKa do composto e pH do meio fisiológico. A forma ionizada sofre solvatação, o que impede a sua absorção por transporte passivo. Assim, alterações na estrutura química remetem a modificações nas propriedades físico-químicas que influenciam diretamente nos processos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) (Swaan, 1998; Barreiro, Fraga, 2001).

Em estudos de QSAR, os parâmetros físico-químicos mais utilizados para expressar a hidrofobicidade são o LogP e a constante de hidrofobicidade π de Hansch.

3.3.1.1 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (LOG P)

O conceito de coeficiente de partição (P) de uma dada entidade química pode ser definido como a concentração da substância na fase orgânica (C_{org}) pela razão da concentração da substância na fase aquosa (C_{aq}), sob condições de equilíbrio termodinâmico (equação 1) (Barreiro, Fraga, 2001; Kubinyi, 1993).

$$P = \frac{C_{org}}{C_{aq}} \quad \text{ou} \quad \text{LogP} = \text{Log}C_{org} - \text{Log}C_{aq} \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

P = coeficiente de partição

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

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

Os valores obtidos da equação 1 podem ser positivos ou negativos. Valores de LogP positivos evidenciam que o composto em questão apresenta alta afinidade pela fase orgânica (apresenta alta hidrofobicidade), enquanto que valores de LogP negativos indicam a alta solubilidade do composto em água, ou seja, apresentam baixa hidrofobicidade (Silverman, 2004).

Para determinação do coeficiente de partição, o sistema octanol/tampão fosfato pH 7,4 é considerado o mais adequado, visando sua aplicação em estudo de QSAR. As vantagens do uso do octanol como solvente são a grande capacidade de dissolução de compostos químicos, a não volatilidade em temperatura ambiente, a não quebra das ligações das moléculas ao serem transferidas da fase orgânica para a fase aquosa, a facilidade para as medições diretas por UV, a pouca miscibilidade em água e a capacidade de dissolução de até 2,3 M de água

sob condições de equilíbrio (Hansch, Sammes, Taylor, 1990; Kubinyi, 1979; Rekker, Mannhold, 1992; Tavares, 2004).

A grande capacidade de dissolução de vastos números de compostos orgânicos, bem como a capacidade de dissolução de certa quantidade de água, é compreensível pelo fato do octanol apresentar extensa cadeia carbônica e a presença do grupo hidroxila. O grupo hidroxila é responsável por agir como doador e como receptor na formação de ligações de hidrogênio. Como consequência, 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 expressem apenas as interações hidrofóbicas (Kubinyi, 1993; Rekker, Mannhold, 1992; Tavares, 2004).

3.3.1.2 DETERMINAÇÃO DO LOG P

Um dos métodos experimentais mais simples para determinação do coeficiente de partição é o de “shake-flask”, que se fundamenta na dissolução de um composto químico em sistema bifásico formado por um solvente polar e um solvente apolar (Kubinyi, 1993; Hansch, Sammes, Taylor, 1990; Tavares, 1993). Este método é adequado, particularmente, para substância com valor de pKa entre 0 e 4, porém as substâncias devem apresentar alto grau de pureza para determinação confiável do respectivo coeficiente de partição (Hansch, Sammes, 1990).

Outros métodos utilizados para determinação do coeficiente de partição, que se mostram mais vantajosos, são a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia em camada delgada. As principais vantagens dos métodos cromatográficos frente ao *shake flask* são a rapidez na execução dos ensaios, a precisão de determinação do coeficiente de partição e a não exigência de alto grau de pureza dos compostos. Para o uso de métodos que utilizam cromatografia líquida de alta eficiência para determinação do LogP são necessários padrões com valores de LogP conhecidos em sistema octanol/água, para calibração do cromatógrafo. Estes métodos cromatográficos foram responsáveis por aumentar a velocidade de execução dos ensaios, não obstante, o número de compostos avaliados experimentalmente é insignificante, quando comparados ao número de substâncias para quais estes dados são necessários (Kubinyi, 1979; Tavares, 2004).

Assim, na tentativa de resolver o problema exposto, métodos teóricos surgiram para estimar o coeficiente de partição. Estes métodos teóricos consistem do uso de ferramentas computacionais capazes de calcular o coeficiente de partição com a alta capacidade preditiva, dispensando, muitas vezes, a necessidade de determinação experimental. Contudo, estes

programas não conseguem calcular o LogP de moléculas que apresentam anéis aromáticos justapostos e compostos iônicos (Kubinyi, 1993; Hansch, Sammes, Taylor, 1990).

3.3.1.3 PARÂMETRO DE HANSCH E FUJITA (π)

Hansch & Fujita, em 1964, definiram constante de hidrofobicidade, π , como medida de contribuição hidrofóbica de grupos substituintes para o coeficiente de partição da molécula como um todo, sendo considerado como um parâmetro constitutivo e aditivo. É aditivo porque múltiplos substituintes exercem a mesma influência que a soma dos mesmos quando considerados isoladamente; é considerado constitutivo pelo fato de a mudança de posição de um mesmo substituinte poder alterar a hidrofobicidade e, conseqüentemente, o Log P. Hansch definiu a constante de hidrofobicidade (π) que leva seu nome utilizando os mesmos princípios adotados por Hammett, para determinação da constante σ (ver item 3.3.2.1). A constante de hidrofobicidade de Hansch pode ser obtida através da relação logarítmica entre o coeficiente de partição de um composto substituído e o coeficiente de partição do análogo não substituído (equação 2) (Kubinyi, 1993; Selassie, 1998; Tropsha, 1998; Silverman, 2004).

$$\pi_x = \text{Log } P_{R-X} - \text{Log } P_{R-H} \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

π_x = parâmetro demonstra a contribuição hidrofóbica do grupo substituinte X

P_{R-X} = coeficiente de partição do composto X- substituído

$\text{Log } P_{R-H}$ = coeficiente de partição do composto não substituído

De acordo com a equação 2, valores positivos de π indicam que o substituinte é mais hidrofóbico do que o composto não substituído (quando $X = H$) e, analogamente, valores negativos de π indicam que o substituinte é menos hidrofóbico que o hidrogênio (Hansch, Leo, 1979). Atualmente, os valores de Log P e π podem ser calculados empiricamente, porém deve-se procurar relacioná-los com dados experimentais (Silverman, 2004).

3.3.2 EFEITOS ELETRÔNICOS

As propriedades eletrônicas avaliam a influência que determinados grupos substituintes exercem na distribuição eletrônica de uma dada molécula. Em oposição às propriedades moleculares, tal como a hidrofobicidade, os parâmetros eletrônicos podem

referir-se a determinado átomo ou grupo substituinte da estrutura química e descrevem interações polares entre o fármaco e o receptor (Kubinyi, 1993). O efeito eletrônico pode ser expresso por vários parâmetros, dentre os quais podem-se citar a constante Hammett (σ), as constantes de Swain (\mathfrak{S}) e Lupton (\mathfrak{R}) e o pka (Selassie, 1998; Tropsha, 1998).

3.3.2.1 CONSTANTE DE HAMMETT

Hammett postulou que os efeitos eletrônicos (ressonância e indução) para um grupo de substituintes deveriam ser similares para diferentes reações orgânicas. Assim, esses valores poderiam ser estimados a partir de uma reação orgânica padrão, predizendo a velocidade das reações orgânicas (Silverman, 2004).

O trabalho de Hammett constitui-se da avaliação da ionização de uma série de ácidos benzoicos *para* ou *meta* substituídos em temperatura de 25 °C em água, buscando analisar a relação entre a constante de ionização do ácido benzoico não substituído ($X = H$) com a constante do ácido benzoico substituído (Silverman, 2004). A figura 7 mostra a reação de ionização de ácidos benzoicos *para* ou *meta* substituídos.

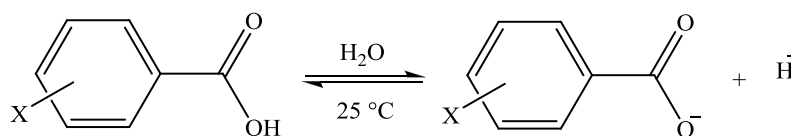


Figura 7: Reação de ionização de ácidos benzoicos *para* ou *meta* substituídos.

Hammett observou que a presença de substituintes, ligados na posição *meta* ou *para* do ácido benzoico, influenciava a reação de ionização, de modo a favorecê-la ou não (Selassie, 1998; Tropsha, 1998). A partir desta análise, Hammett propôs uma relação a partir da observação da existência da relação linear entre o logaritmo da constante de ionização do ácido benzoico não substituído e o logaritmo da constante de ionização do ácido benzoico substituído (equação 3). A partir dessa relação, foi possível a determinação do valor da constante σ de Hammett para vários grupos substituintes, utilizando a reação de ionização do ácido benzoico.

$$\sigma = \text{Log} \left(\frac{K_x}{K_0} \right) = \text{Log}K_x - \text{Log}K_0 \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

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

K_x = constante de ionização do ácido benzoico X – substituído

K_0 = constante de ionização do ácido benzoico não substituído

De acordo com a reação de ionização do ácido benzoico, quando X é um grupo substituinte receptor de elétrons, a constante de equilíbrio aumenta (a reação é favorecida em sentido da formação dos produtos), por atrair a nuvem eletrônica do grupo carboxila, facilitando a liberação de prótons. Por outro lado, quando X é um grupo doador de elétrons, a constante de equilíbrio diminui (Silverman, 2004).

Esse comportamento é explicável baseando-se no estado de transição das reações orgânicas. Um grupo receptor de elétrons poderá estabilizar a carga negativa do estado de transição, distribuindo a carga de forma mais homogênea por toda superfície da molécula, aumentando, assim, a estabilidade do intermediário e diminuindo a energia de ativação da reação. Quando se trata de um grupo doador de elétrons, o estado de transição é desestabilizado, diminuindo o valor da constante de equilíbrio, desfavorecendo a reação no sentido de formação dos produtos (Silverman, 2004).

O parâmetro σ , de Hammett, depende do substituinte ou átomo e da posição que este ocupa no anel aromático. Esta constante mede a influência eletrônica referente a um dado substituinte independente da molécula ou do mecanismo da reação. A constante σ_m (substituinte na posição *meta*) resulta, basicamente, do efeito indutivo e a constante σ_p (substituinte na posição *para*) reflete os efeitos de ressonância e indutivo. Por este fato, constantes de σ_p e σ_m , para um mesmo substituinte, geralmente, não são as mesmas (Tavares, 1993; Hansch, Leo, Taft, 1991).

A partir de uma série de valores de σ obtidos para diversos grupos químicos, Hammett propôs uma relação linear de energia livre, conhecida como Equação de Hammett (equação 4) (Tavares, 1993). Este autor atribuiu como sendo zero a constante σ do ácido benzoico não substituído ($\sigma_H = 0$); assim, para valores positivos, σ refere-se a grupos receptores de elétrons; já para valores negativos, representa substituintes doadores de elétrons (Silverman, 2004).

$$\text{Log } K_x = \rho\sigma + \text{Log } K_H \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

K_x = constante de equilíbrio ou de velocidade do composto substituído

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

ρ = constante de reação

σ = constante de grupo

Os valores de ρ dependem do tipo de reação e de suas condições, como, por exemplo, temperatura e solvente, por isso é definido como constante da reação. O ρ é utilizado como medida de sensibilidade da reação para os efeitos eletrônicos dos substituintes nas posições *meta* e *para*. Altos valores de ρ , positivos ou negativos, indicam a grande sensibilidade para os efeitos do substituinte. Reações que são favorecidas por doação de elétrons no estado de transição (por exemplo, carbocátions) têm valores negativos de ρ . Por outro lado, reações que são favorecidas pela retirada de elétrons (por exemplo, carbânions) apresentam valor positivo de ρ (Brownder, 1990; Tute, 1971).

Alguns estudiosos observaram certas limitações da equação proposta por Hammett, como, por exemplo, a não adequação ao estudo de alifáticos e aromáticos com presença de substituintes na posição *orto*. Na tentativa de gerar um modelo matemático mais amplo, Taft e Lewis sugeriram a decomposição da constante σ em componentes de efeito de ressonância e efeito indutivo e observaram a influência que cada componente exerce frente à velocidade e ao equilíbrio reacional. A decomposição da constante σ em componentes de efeitos indutivos e de ressonância pode ser obtida de acordo com as equações 5 e 6 (Taft, Lewis, 1958; Tavares, 1993).

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

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

Em que:

σ_p e σ_m = são valores da constante de Hammett para substituintes na posição *para* e *meta* no anel benzênico, respectivamente

σ_I e σ_R = valores da contribuição para os efeitos indutivos e de ressonância, respectivamente

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

O desmembramento da constante σ possibilitou o emprego da equação de Hammett expandida (equação 7). Em sistemas em que a equação de Hammett original não apresenta boa correlação, pode-se empregar a equação de Hammett expandida, a qual permite determinar a influência que o efeito de ressonância ou indutivo aplica sobre a velocidade da reação ou propriedade analisada (Amaral, 1979; Brownder, 1990; Hansch, Leo, 1979; Shorter, 1978).

$$\text{Log } K_x = \rho_I \sigma_I + \rho_R \sigma_R + \text{Log } K_H \quad \text{Equação 7}$$

Em que:

K_x = constante de ionização do composto substituído

K_H = constante de ionização do composto não substituído

ρ_I e ρ_R = coeficientes angulares da equação de Hammett relativos aos efeitos indutivos e de ressonância, respectivamente

σ_I e σ_R = contribuições dos efeitos indutivos e de ressonância, respectivamente

3.3.2.2 CONSTANTES DE SWAIN (\mathfrak{S}) E LUPTON (\mathfrak{R})

Swain e Lupton propuseram uma correção da constante σ . Estes autores associaram os efeitos indutivos/campo (\mathfrak{S}) linearmente ao efeito de ressonância (\mathfrak{R}), sendo esta combinação equivalente à constante σ , de acordo com a equação 8.

$$\sigma = f \mathfrak{S} + r \mathfrak{R} \quad \text{Equação 8}$$

Em que:

σ = constante de grupo de Hammett

\mathfrak{S} = efeitos indutivos de campo

\mathfrak{R} = representa o efeito de ressonância

f e r = coeficientes empíricos independentes

3.3.3 PARÂMETROS ESTEREOQUÍMICOS

Alguns parâmetros relacionados ao volume têm sido usados para descrever efeitos de natureza estereoquímica, tais como volume de van der Waal, volume molar, refratividade molar e outros (Tavares, 2004). A primeira tentativa para obtenção de um parâmetro estereoquímico, que pudesse ser utilizado em estudos de QSAR-2D, foi realizada por Taft. Este autor reconheceu a necessidade de separar efeitos estereoquímicos de efeitos eletrônicos.

Taft estudou a hidrólise de acetatos substituídos sob condições ácidas e básicas (Kubinyi, 1993). Assim, o primeiro parâmetro estereoquímico numericamente definido foi o parâmetro *Es*, que é a relação logarítmica das constantes de hidrólise dos correspondentes análogos substituídos e não substituídos.

$$Es = \text{Log}(k/k_0)_A$$

Equação 9

Em que:

Es: constante proposta por Taft

K: constante de hidrólise ácida do acetato α -substituído

K₀: constante de hidrólise ácida do acetato não substituído

Ressalta-se que a utilização do parâmetro de Taft mostrou-se inadequada por não considerar outros fatores que influenciam a reação de hidrólise utilizada como padrão em sua definição, o que torna o parâmetro *Es* sem empregabilidade (Hansch, Leo, 1995; Tavares, 1993, 2004).

O volume de van der Waals (*V_w*) é o parâmetro que pode ser definido como sendo o volume impenetrável por outra molécula, obedecendo à lei de ação das massas. É importante reconhecer que as coordenadas tridimensionais que definem determinada região da molécula podem ser alteradas em função do estado físico, resultando, portanto, em restrição do emprego deste parâmetro em estudos de QSAR (Hansch, Sames, Taylor, 1990; Kubinyi, 1993; Hansch, Leo, 1995; Tavares, 2004).

A massa molecular (*MM*) é outro parâmetro estereoquímico empregado em estudo de QSAR. Mesmo que esteja indiretamente relacionada com o volume da molécula, a massa molecular não é capaz de expressar convenientemente o seu perfil tridimensional (Hansch, Sames, Taylor, 1990; Kubinyi, 1993; Tavares, 2004)

Na tentativa de encontrar um parâmetro estereoquímico mais confiável para os estudos de QSAR, Verloop e colaboradores desenvolveram um conjunto de parâmetros que se mostram mais adequados na expressão do aspecto tridimensional dos grupos substituintes (Verloop, Hoogenstraaten, Tipker, 1967). Os parâmetros de esterimol podem ser decompostos em L, B1, B2, B3, B4 e B5. Estes parâmetros baseiam-se em distância de ligações e ângulos padrões de ligação. A letra L representa o comprimento do substituinte, enquanto as letras B1 a B5 representam a largura em 5 diferentes direções. Estes parâmetros são gerados em um programa computacional chamado *Sterimol Program*, que calcula os efeitos estereoquímicos de grupos substituintes a partir de ângulos de ligação padrão, raio de van der Waals e

comprimentos de ligação. Os parâmetros de esterimol são aplicáveis para quaisquer substituintes (Hansch, Sames, Taylor, 1990). O padrão direcional proposto por Verloop e colaboradores está disposto na figura 8.

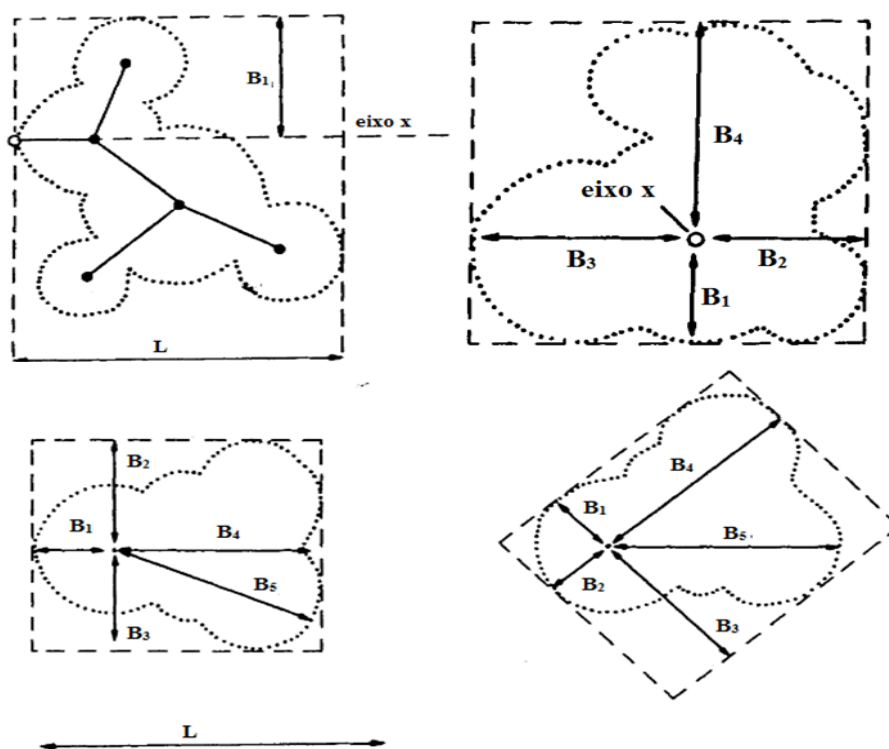
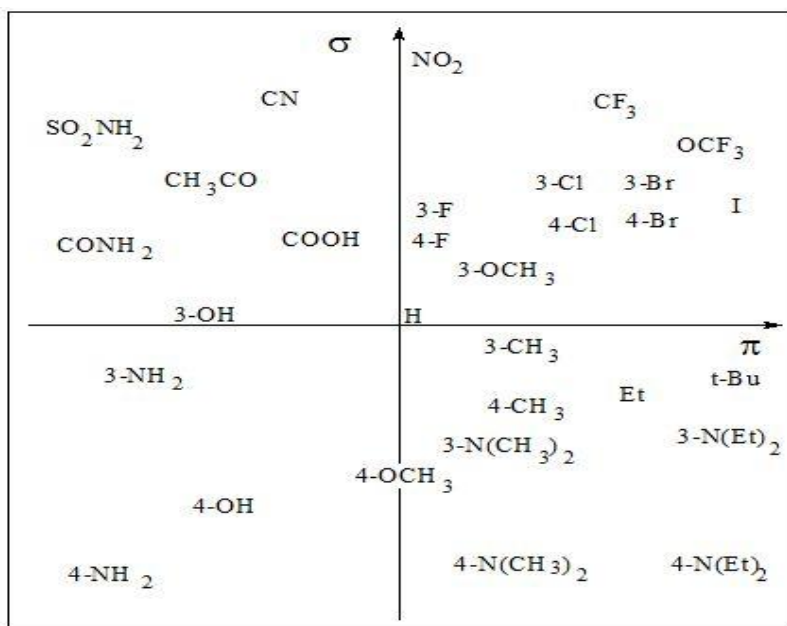


Figura 8: Direção vetorial dos parâmetros de esterimol, L, B₁, B₂, B₃, B₄ e B₅ (Kubinyi, 1979).

3.4 PLANEJAMENTO DE SÉRIES DE COMPOSTOS PARA ESTUDOS DE QSAR

A escolha dos grupos substituintes de forma planejada é de grande importância para que se obtenham os análogos adequados aos estudos de relações quantitativas estrutura-atividade. Craig (1971) propôs um diagrama que correlaciona σ e π de grupos substituintes em distribuição bidimensional, em um sistema cartesiano, que fornece método de seleção racional de grupos substituintes para estudos de QSAR. Este método qualitativo e simples de visualizar as propriedades relativas de diferentes substituintes apresenta os valores de σ , como ordenada, e de π , como abscissa, de acordo com a figura 9.



σ : constante de grupo de Hammett

π : constante de hidrofobicidade de Hansch

Figura 9: Diagrama proposto por Craig (1971) para escolha de grupos substituintes.

A escolha adequada de grupos substituintes utilizando este método deve ser feita buscando a maior dispersão possível entre os quatro quadrantes, isto é, deve-se evitar a colinearidade entre parâmetros, evitando, assim, a obtenção de correlações não representativas do fenômeno pesquisado (Tavares, 2004). A presença de grupo nitro (receptor de elétrons), grupo amina (doador de elétrons), cloro e bromo (caráter polar), metila (doador de elétrons) e hidrogênio (considerado o composto de partida do diagrama) é fundamental na definição da série, em razão de suas características físico-químicas (Kubinyi, 1993; Craig, 1971).

3.5 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE

O primeiro trabalho responsável por introduzir o conceito de estudos quantitativos de relações estrutura-atividade (QSAR) foi elaborado por Crum-Brown e Fraser em 1868 (Crum-Brown, Fraser, 1868). Estes autores descreveram o resultado obtido após sucessivas injeções de derivados de morfina, estricnina e atropina em cobaias. Em seus trabalhos, eles reconheceram que a alquilação do nitrogênio básico, resultando em um nitrogênio quaternário com carga positiva, produzia diferenças nos efeitos biológicos observados. Assim, eles concluíram que a atividade biológica apresentava correlação com a estrutura química (Gaudio, 1996).

As primeiras tentativas de expressar a relação da estrutura química e da atividade biológica datam do início do século passado; porém, o trabalho considerado como o

introdutório dos estudos de QSAR surgiu somente em 1964. Os trabalhos elaborados por Hansch e Fujita e por Free e Wilson foram responsáveis por desenvolver a metodologia que posteriormente seria denominada como Análise de Hansch (Wermuth, 2003).

O grande avanço obtido em QSAR foi resultado da combinação de diferentes parâmetros físico-químicos, de forma linear aditiva em uma equação, ou seja, a atividade biológica de uma dada substância pode ser expressa em função de descritores estruturais. Assim, estabeleceu-se que as relações quantitativas estrutura-atividade biológica estão vinculadas com a variação de energia livre, ΔG , envolvidas na interação do fármaco receptor. Esta variação pode ser decomposta em termos independentes e aditivos relacionados às propriedades físico-químicas, como, por exemplo, hidrofobicidade, efeitos eletrônicos e estereoquímicos, de acordo com a equação 10 (Kubinyi, 1993; Tavares, 2004).

$$AB = a\sigma + b\pi + cEs + d$$

Equação 10

Em que:

AB: atividade biológica

σ : constante de substituinte de efeito eletrônico

π : constante de substituinte de hidrofobicidade

***Es*:** constante de substituinte referente a efeitos estereoquímicos

a, b, c: coeficientes que expressam a contribuição de cada propriedade para a atividade biológica

d: constante

A análise de Hansch relaciona atividade biológica com propriedades físico-químicas, através de modelos utilizando regressões linear, linear múltipla e não linear. A análise de Hansch é amplamente difundida e empregada em trabalhos na área de química medicinal. O emprego deste modelo é pertinente às moléculas de estruturas químicas semelhantes, que podem diferir em um ou mais grupos em posições pré-definidas e que apresentam o mesmo mecanismo de ação. Tendo em vista os inúmeros fatores que são responsáveis por regular a bioatividade de fármacos, a análise de Hansch tem por finalidade caracterizar e isolar as contribuições de cada um dos fatores físico-químicos responsáveis pela atividade biológica (Hansch, 1969; Hansch, Fujita, 1964).

3.5.1 MODELOS UTILIZADOS EM QSAR

O primeiro modelo elaborado para estudos de QSAR é conhecido como Equação de Hansch e se refere a uma regressão linear. A proposição desta equação é considerada como marco inicial para o reconhecimento da análise de Hansch (Tavares, 2004).

$$\text{Log } 1/C = a\text{LogP} + \sigma\rho + b \quad \text{Equação 11}$$

Em que:

C: concentração molar responsável por produzir o efeito biológico

Log 1/C: potência biológica

LogP: coeficiente de partição

a, σ , ρ , b: coeficientes determinados pela análise de regressão para o conjunto de dados

O emprego do modelo linear é mais apropriado quando a atividade biológica é avaliada *in vitro*, como, por exemplo, em uma reação enzima-inibidor ou em peças anatômicas simples e isoladas, como pequenas extensões de parede intestinal, fibras musculares e artérias. No caso de sistemas biológicos complexos, relações lineares entre hidrofobicidade e atividade biológica somente são aplicáveis quando o conjunto de moléculas testadas possui extensão limitada de hidrofobicidade. Se a hidrofobicidade excede certos limites, será observado decréscimo da atividade biológica (Leo, Hansch, Elkins, 1971; Kubinyi, 1979). Como a absorção de compostos bioativos não obedece a uma relação linear em função da hidrofobicidade, Hansch, revendo seus estudos, propôs uma extensão, do modelo linear para o modelo parabólico.

A primeira adequação proposta por Hansch e colaboradores, quanto ao modelo linear, foi a construção do modelo parabólico. Desse modo, o modelo parabólico apresenta comportamento mais semelhante ao das moléculas quando na biofase, já que a atividade aumenta em virtude do aumento da hidrofobicidade até atingir um limite máximo e, logo após, ocorre o decréscimo, apresentando perfil parabólico, de acordo com a equação 12 (Tavares, 2004; Kubinyi, 1995; Hansch, Fujita, 1964; Hansch, Leo, Taft, 1991).

$$\text{Log}(1/C) = a(\text{LogP})^2 + b\text{LogP} + \rho\sigma + c \quad \text{Equação 12}$$

Em que:

C: concentração molar responsável por produzir o efeito biológico

Log 1/C: potência biológica

LogP: coeficiente de partição

σ : constante de substituinte de efeito eletrônico

a , ρ , b: coeficientes determinados pela análise de regressão para o conjunto de dados

Outro modelo, que se apresenta com melhores ajustes quando comparado aos demais, é o modelo bilinear. Este modelo foi proposto por Kubinyi, em 1977, quando ele inseriu o termo bilinear, β , na equação. Este termo assume caráter probabilístico e descreve o movimento dos compostos em sistemas multicompartimentados, que têm extrema dependência do coeficiente de partição P. Este modelo apresenta características mistas entre o modelo parabólico e o linear. Em regiões ascendentes e descendentes assume características lineares, enquanto que, no seu ponto de máximo, apresenta característica parabólica (Tavares, 2004). O modelo bilinear é descrito pela equação 13.

$$\text{Log } 1/C = a \text{ LogP} - b \text{ Log } (\beta P + 1) + c \quad \text{Equação 13}$$

Em que:

C: concentração molar responsável por produzir o efeito biológico

Log 1/C: potência biológica

β : termo bilinear

LogP: coeficiente de partição

σ : constante de substituinte de efeito eletrônico

a , ρ , b: coeficientes determinados pela análise de regressão para o conjunto de dados

3.6 COMPOSTOS NITRO-HETEROCÍCLICOS

Compostos orgânicos que apresentam em sua estrutura o grupo nitro estão inclusos em diversas classes terapêuticas, como, por exemplo, nos ansiolíticos, nos antineoplásicos, nos antibacterianos, nos antivirais, nos antifúngicos, nos anti-hipertensivos, nos miorreaxantes, nos vasodilatadores e nos antiparasitários (Katzung, 2003; Raether, Hânel, 2003; Korolkovas,

França, 2005; Rang *et al.*, 2004; Viodé *et al.*, 1999). Além das aplicações terapêuticas citadas, nitrocompostos são utilizados de maneira indevida como estabilizantes de vinhos, conservantes de alimentos e na indústria têxtil (Debnath *et al.*, 1993).

Introduzidos na terapêutica na década de 1940, por Dodd e Stillman, os primeiros compostos nitro-heterocíclicos empregados como fármacos foram os nitrofuranos (Dood, Stillman, 1985). Desde então, foram sintetizados inúmeros compostos nitro-heterocíclicos para serem empregados frente a vários microrganismos, observando-se que a maioria dos derivados ativos apresentava atividade frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e algumas espécies de protozoários, como, por exemplo, *T. cruzi* (Anand, Remers, 1998; Raether, Hañel, 2003; Dodd, Stillman, 1985; Korolkovas, Burckhalter, 1982).

Quanto aos nitrofuranos, somente alguns compostos são utilizados na prática médica. Isso porque muitos fármacos desta classe apresentam toxicidade incompatível à condição de fármaco (Chamberlain, 1976; Kaliszan, 1990; Miura, Requendorf, 1967; Paul, Paul, 1964). Cerca de 10% dos pacientes em tratamento com fármacos nitrofurânicos queixam-se dos efeitos colaterais; dentre os mais frequentes citam-se vômitos, náuseas, diarreias, além da possibilidade de reações de hipersensibilidade e anemia hemolítica nos indivíduos com deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (Korolkovas, Burckhalter, 1982).

Cera de 400 milhões de pessoas, principalmente em países tropicais e mediterrâneos, nascem com alteração de um gene no cromossomo X, responsável por codificar a enzima G6PD. Esta deficiência gera danos às membranas dos eritrócitos; entretanto, sem sintomas clínicos. Porém, se a taxa de H_2O_2 aumenta devido ao uso de um medicamento, por exemplo, começa a ocorrer o acúmulo de H_2O_2 , que é o responsável pela lise das membranas dos eritrócitos, o que acarreta em quadro clínico de anemia e icterícia nos pacientes (Halliwell, Gutteridge, 1998).

Não obstante, esta classe de fármaco tem despertado interesse da comunidade científica, com o intuito de descobrir novos análogos que possam ser empregados como fármacos e que apresentem menos efeitos adversos. A figura 10 mostra as estruturas de fármacos nitrofurânicos utilizados na terapêutica atual.

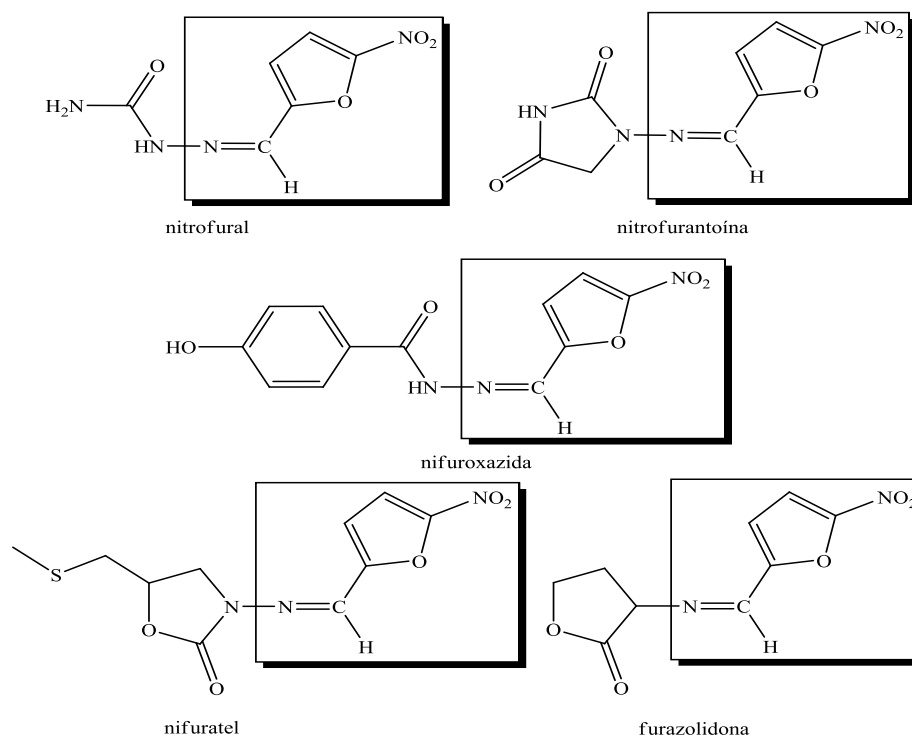


Figura 10: Compostos nitrofurânicos utilizados na terapêutica.

Todas as moléculas da figura 10 apresentam em comum o grupo azometínico ($-\text{CH}=\text{N}-\text{N} <$), ligado ao anel 5-nitro-2-furfurilideno. A presença do grupo azometínico ligado ao sistema 5-nitrofurânico é responsável por um sinergismo farmacológico determinante para atividade antimicrobiana. A figura 11 mostra o grupamento farmacofórico de compostos nitrofurânicos (Foye, Lemke, Willians, 1995).

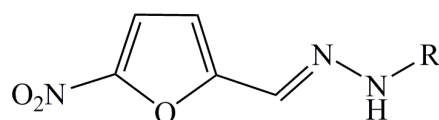


Figura 11: Grupo farmacofórico de compostos nitrofurânicos.

Não se sabe o exato mecanismo de bioatividade desta classe de fármacos, mas acredita-se que a maioria dos nitrocompostos com ação antiparasitária e antibacteriana apresenta, como possível mecanismo, o processo de biorredução enzimática (Viodé *et al.*, 1999; Paul, Paul, 1964). Em geral, o grupo nitro apresenta grande capacidade de interferir no metabolismo do oxigênio. Em condições anaeróbias, o radical ânion, formado na primeira etapa, pode ser transformado em seu derivado nitroso correspondente. Este derivado nitroso apresenta capacidade de se ligar aos grupos tióis presentes na célula e, em seguida, é submetido a uma nova redução, formando amina.

Já em aerobiose, o radical nitro ânion reage com oxigênio formando ânions superóxidos, que são transformados em peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase (SOD). O acúmulo de peróxido na célula pode originar radicais $\cdot\text{OH}$, que são espécies químicas altamente reativas e tóxicas para a célula (Docampo, Moreno, 1984; Candenas, 1989). A figura 12 mostra as possíveis vias químicas que o grupo nitro pode sofrer em diferentes condições.

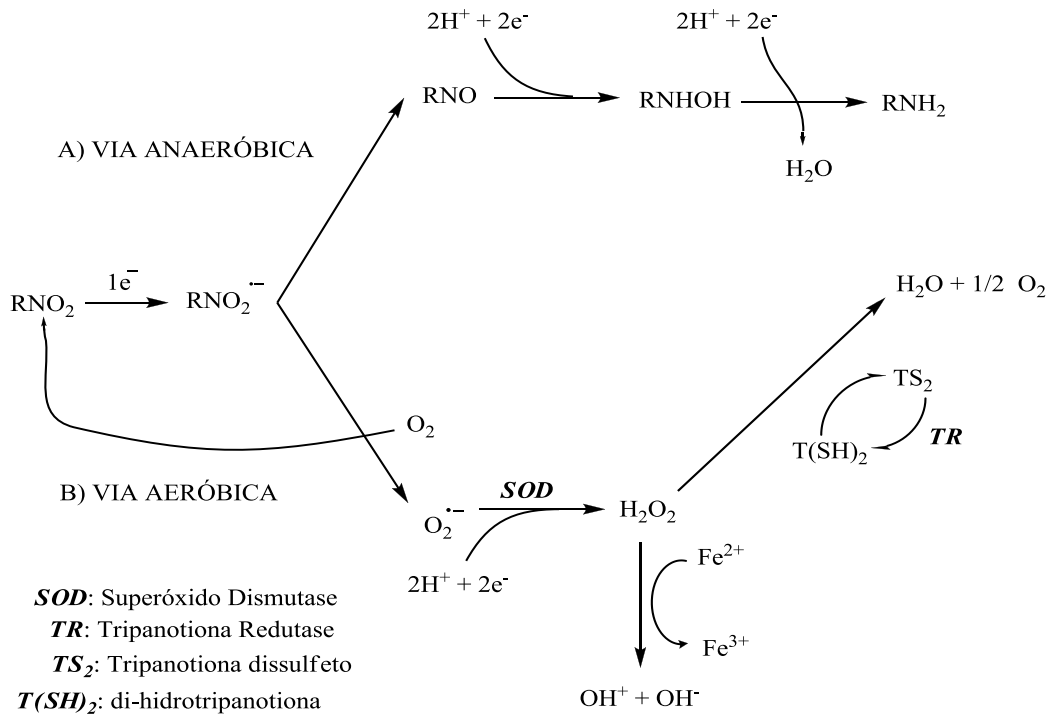


Figura 12: Biorredução do grupo nitro (Viodé *et al.*, 1999).

Devido à capacidade mutagênica em células de procariotos e protozoários, despertou-se o questionamento do possível potencial carcinogênico de compostos 5-nitrofurânicos em células de mamíferos. Em 1969, Morris e colaboradores relataram a atividade carcinogênica de cinco derivados desta classe, ao incluir na dieta de ratos 0,1-0,3% de composto a ser analisado. Este trabalho levou à investigação do possível mecanismo bioquímico envolvido na indução da mutagênese (Dayan, Deguigand, Truzman, 1985; Dayan *et al.*, 1987; Oliver, 1979).

Visando maior compreensão sobre os efeitos mutagênicos da nifuroxazida *in vitro*, Dayan e colaboradores (em 1985 e 1987) constaram que este fármaco pode manifestar atividade mutagênica sobre algumas cepas de *Salmonella thyphimurium*, mas não sobre células de mamíferos (Dayan, Deguigand, Truzman, 1985; Dayan *et al.*, 1987). Uma vez que

foi afastada a possibilidade do potencial mutagênico desses compostos em células de mamíferos, a comunidade científica retomou o seu interesse pela investigação de nitrocompostos, especialmente com atividade antimicrobiana e antiparasitária.

Características de baixa toxicidade, amplo espectro de ação, baixa capacidade de indução de resistência bacteriana e facilidade do emprego de metodologias de modificação molecular denotam o potencial da nifuroxazida como composto líder em estudos de QSAR. Assim, para doenças de grande importância epidemiológica, como a tripanossomíase americana, a obtenção de análogos à nifuroxazida se mostra como estratégia promissora para lograr novas opções de tratamento.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SÍNTESE

4.1.1 PLANEJAMENTO DA SÉRIE

A escolha dos substituintes para a série 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas foi efetuada empregando-se o diagrama de Craig (1971), de modo a se obter a maior dispersão possível entre os quatro quadrantes. Os compostos planejados neste trabalho estão dispostos na figura 13.

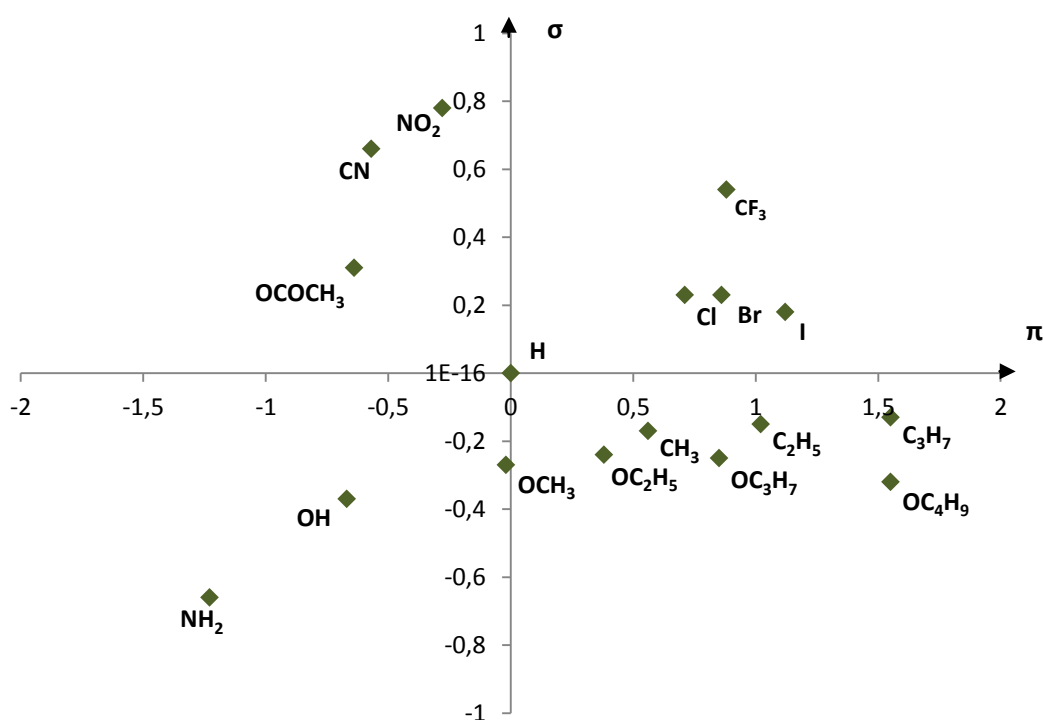
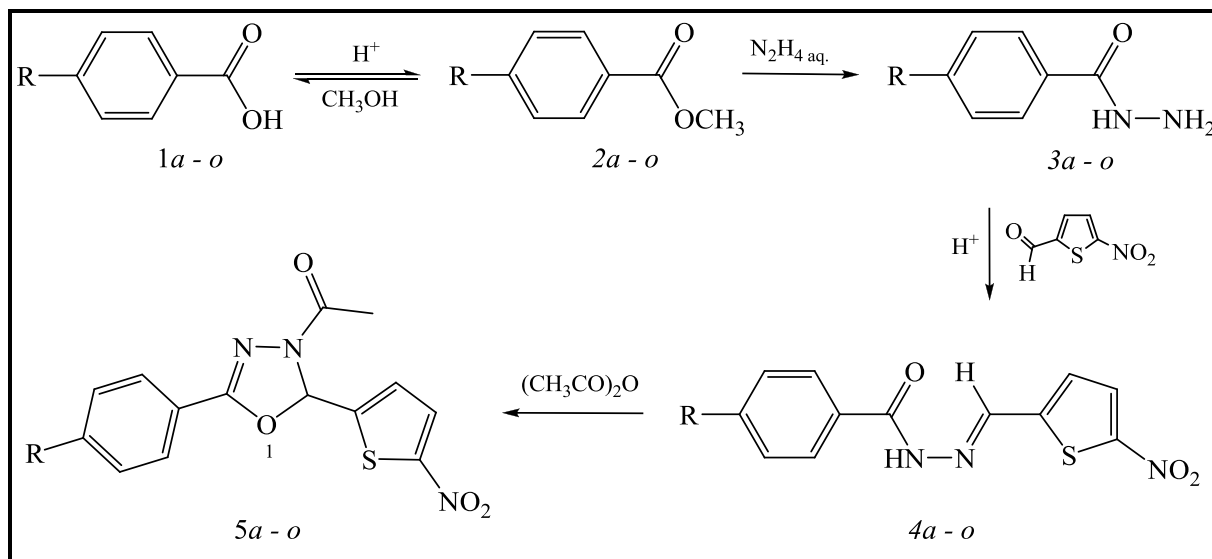


Figura 13: Diagrama de Craig (1971) apresentando o planejamento para série dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos.

4.1.2 SÍNTESE DA SÉRIE DE DERIVADOS 1,3,4-OXADIAZOLÍNICOS

Para obtenção dos compostos planejados, são necessárias quatro etapas, a saber: obtenção de benzoatos de metila, obtenção de benzidrazidas substituídas, obtenção das bases de Schiff e obtenção dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos. A seguir, estão descritos os métodos que foram empregados para obtenção dos compostos finais a partir dos ácidos benzoicos substituídos, bem como os 15 substituintes que foram avaliados frente ao *T. cruzi* dentre os 17 planejados, através da rota sintética descrita na figura 14.



5a-o	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o
R	I	Br	Cl	CN	OC ₂ H ₅	OC ₄ H ₉	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇	NO ₂	OCOCH ₃	OCH ₃	OC ₃ H ₇	CF ₃	H	CH ₃

Figura 14: Rota sintética para obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos.

Ressalta-se que dos 15 compostos que tiveram suas atividades anti-*T. cruzi* determinadas, 11 foram sintetizados neste trabalho, em que R foi igual a: I, Br, Cl, CN, OC₂H₅, OC₄H₉, C₂H₅, C₃H₇, NO₂, OCOCH₃, OCH₃. Com o intuito de expandir a série de estudo deste trabalho, 4 derivados oxadiazolínicos (R: OC₃H₇, CF₃, H e CH₃), que haviam sido previamente sintetizados e identificados por Leonardo Viana de Almeida (2009), foram gentilmente cedidos e incluídos nesta série para determinação da atividade anti-*T. cruzi*.

4.1.2.1 OBTENÇÃO DAS BASES DE SCHIFF

Partiu-se de 5-nitro-2-tiofenocarboxaldeído (99%, Aldrich Chemical Company, Inc) em solução de água, ácido sulfúrico P.A. (98%, Labsynth), ácido acético glacial (Labsynth) e metanol (Labsynth), na proporção 8:7:8:20 v/v, respectivamente (Tavares, 1993). Aqueceu-se o sistema até temperatura de refluxo, em seguida, adicionou-se a benzidrazida substituída (3 *a-o*), em proporção equimolar sob constante agitação magnética (Agitador Magnético Fisatom). Imediatamente, observou-se a formação de um sólido amorfo, que foi filtrado e recristalizado em dimetilformamida P.A. (Labsynth) e água destilada. As bases de Schiff (4 *a-o*) obtidas foram mantidas em dessecador em presença de pentóxido de fósforo (Aldrich Chemical Company).

4.1.2.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS 1,3,4-OXADIAZOLÍNICOS

Sob atmosfera inerte (gás N₂), adicionaram-se 0,5g (0,002 mol) da base de Schiff substituída (4 *a-o*) em excesso de anidrido acético, 10 mL (0,1 mol). Sob agitação magnética constante, manteve-se o sistema na faixa de temperatura de 90 a 120 °C por período de 6 a 8 horas. Após esta etapa, 10 mL de água destilada foram adicionados e manteve-se o sistema sob agitação constante; houve a formação de sólido amorfo, que foi filtrado e recristalizado com acetona (Labsynth) e água destilada (Rollas, Gulerman, Habibe, 2002). O derivado 1,3,4-oxadiazolínico obtido (5*a-o*) foi mantido em dessecador em presença de pentóxido de fósforo.

4.1.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A confirmação das estruturas dos compostos finais foi efetuada através de análises dos espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C, que se apresentam nos anexos A e B deste trabalho. A faixa de fusão e análise elementar de CHN foi utilizada como critério de pureza.

4.1.3.1 FAIXA DE FUSÃO

As faixas de fusão dos compostos sintetizados foram verificadas em lamínulas de vidro em equipamento digital da marca Micro Química modelo, MQAPF-301.

4.1.3.2 . ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Advance DPX 300 MHz, no Laboratório de Análise Instrumental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Utilizou-se como solvente DMSO-*d*₆ (99,5%, Aldrich Chemical Company) e tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna. A figura 15 apresenta a identificação dos átomos de carbono utilizados nas leituras de RMN ¹³C e RMN ¹H.

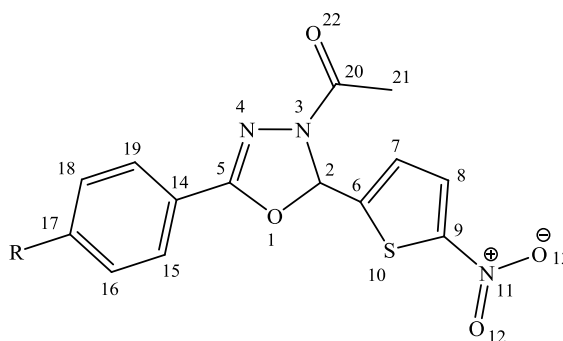


Figura 15: Estrutura padrão para identificação dos átomos de carbono e hidrogênio utilizados na interpretação dos espectros de RMN ¹³C e RMN ¹H.

4.1.3.3 ANÁLISE ELEMENTAR DE CHN

A obtenção dos valores experimentais de análise elementar para a série de compostos sintetizados foi feita em analisador CHN, modelo Elementar Analyser 24013 CHN, Perkin-Elmer, na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

4.1.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA ANTI-*T. cruzi*

Os ensaios de atividade anti-*T. cruzi* foram efetuados no Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, frente a formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, e avaliados na fase estacionária, ou seja, células de 10 dias de incubação (Cerecetto *et al.*, 1999; Aguirre *et al.*, 2002; Aguirre *et al.*, 2004; Aguirre *et al.*, 2005; Aran *et al.*, 2005; Gerpe *et al.*, 2010; Merlino *et al.*, 2010; Jorge, 2010). As células do inóculo foram cultivadas a 28 °C em meio LIT suplementado com 10% de soro bovino (v/v). A porcentagem de inibição do crescimento foi avaliada através de leitura em espectrofotômetro UV/VIS. As cepas, bem como os meios de cultivo, foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Maria Júlia Manso Alves, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.1.4.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE COMPOSTOS A SEREM AVALIADOS

Cada composto foi avaliado em seis diferentes concentrações, respeitando o intervalo de concentração de 3,75 a 20 μM . O etoxi-derivado foi avaliado em intervalo maior de concentrações, pois apresentou diminuta atividade anti-*T. cruzi*, sendo avaliado no intervalo 3,75-40 μM . Para obtenção das concentrações de interesse, preparam-se 6 soluções (A-F), obtidas de acordo com os procedimentos descritos a seguir:

Solução A: através da massa molar, calculou-se a massa equivalente a 50.000 μmol de cada composto, que foram diluídos em 5 mL de DMSO (Cf = 10000 μM / 100% DMSO);

Solução B: adicionaram-se 2 mL da solução A em 3 mL de DMSO (Cf = 4000 μM / 100% DMSO);

Solução C: adicionou-se 0,1 mL da solução B em 4,9 mL de LIT (Cf = 80 μM / 2% DMSO);

Solução D: adicionaram-se 3,0 mL de solução C em 3,0 mL de LIT (Cf = 40 μM / 1% DMSO);

Solução E: adicionaram-se 2,0 mL de solução D em 2,0 mL de LIT (Cf = 20 μM / 0,5% DMSO);

Solução F: adicionaram-se 1,5 mL de solução C em 2,5 mL de LIT ($C_f = 30 \mu M$ / 0,75% DMSO).

Ressalta-se que após as transferências volumétricas, cada solução foi mantida sob constante agitação, de modo a garantir completa homogeneização do sistema.

A obtenção das concentrações, para determinação do valor de IC_{50} a partir das soluções previamente preparadas (soluções A-F), foi lograda em cubetas estéreis, de acordo com a descrição a seguir:

20 μM : adição de 0,5 mL de solução D + 0,5 mL de inóculo (0,5% DMSO);

15 μM : adição de 0,5 mL de solução F + 0,5 mL de inóculo (0,37% DMSO);

10 μM : adição de 0,5 mL de solução E + 0,5 mL de inóculo (0,25% DMSO);

7,5 μM : adição de 0,5 mL de solução G + 0,5 mL de inóculo (0,18% DMSO);

5 μM : adição de 0,25 mL de solução E + 0,25 mL de LIT + 0,5 mL de inóculo (0,12% DMSO);

3,75 μM : adição de 0,25 mL de solução G + 0,25 mL de LIT + 0,5 mL de inóculo (0,09% DMSO).

A figura 16 ilustra os procedimentos adotados para o preparo das soluções A-F, bem como a obtenção das concentrações finais (C_f) em cubetas.

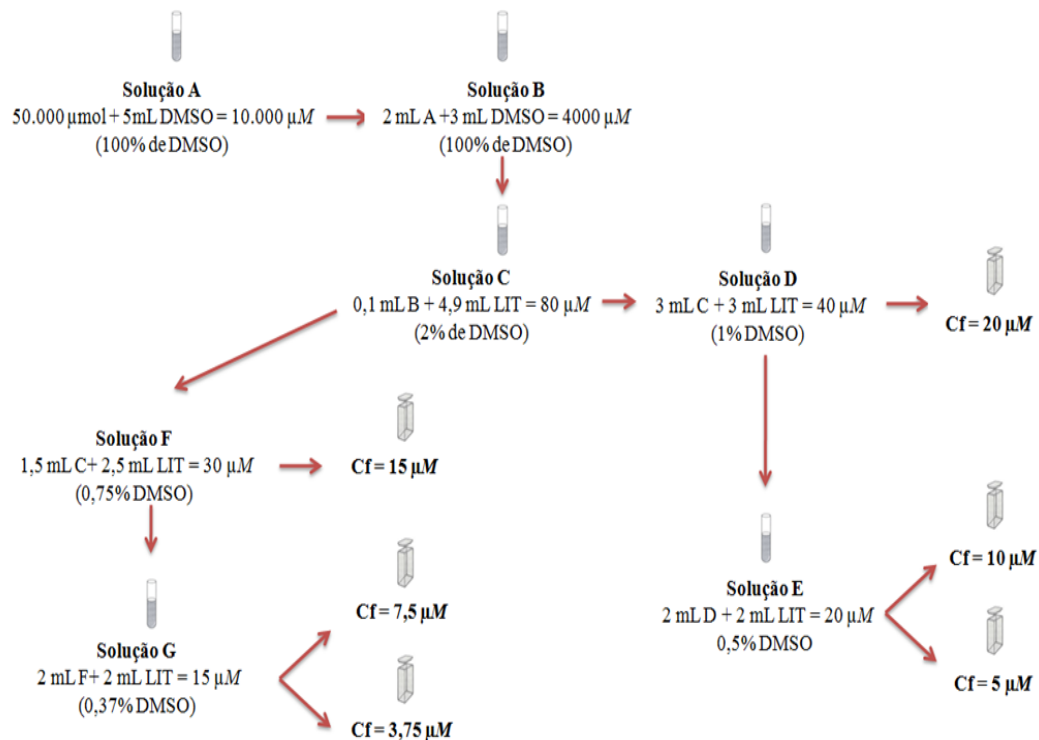


Figura 16: Procedimento adotado para obtenção das concentrações utilizadas nos ensaios de determinação da atividade biológica frente ao *T. cruzi*.

Os ensaios foram efetuados em caixas de cubetas, sendo que para cada caixa foram avaliados 3 compostos por ensaio em 6 diferentes concentrações. Todas as concentrações foram feitas em triplicatas e utilizando um branco para cada diluição (cubetas de 31 a 39 e 71 a 79). Além dos compostos avaliados, cada caixa apresenta, como fármaco padrão, o benznidazol, avaliado em 3 diferentes concentrações. As cubetas 92, 94 e 96 foram utilizadas como os brancos de cada diluição do benznidazol. Já para determinar a influência do DMSO, solvente utilizado para solubilizar os compostos, utilizaram-se soluções controle de DMSO, em concentrações de 0,5% (cubetas 80, 90 e 100) e 1% (cubetas 50, 60 e 70). Para cada caixa, foram utilizados, também, controles positivos (somente 0,5 mL do inóculo e 0,5 mL meio de cultivo (cubetas 10, 20, 30 e 40), de modo a determinar o crescimento parasitário sem quaisquer influências de solvente. Com intuito de determinar a possibilidade da ocorrência de contaminação do meio de cultivo, 2 cubetas foram utilizadas como branco, que consiste somente da adição de 1 mL de meio LIT (cubetas 88 e 98).

A figura 17 apresenta o modelo ilustrativo da caixa utilizada nos ensaios, bem como os procedimentos adotados para se obter as concentrações de interesse dos compostos avaliados.

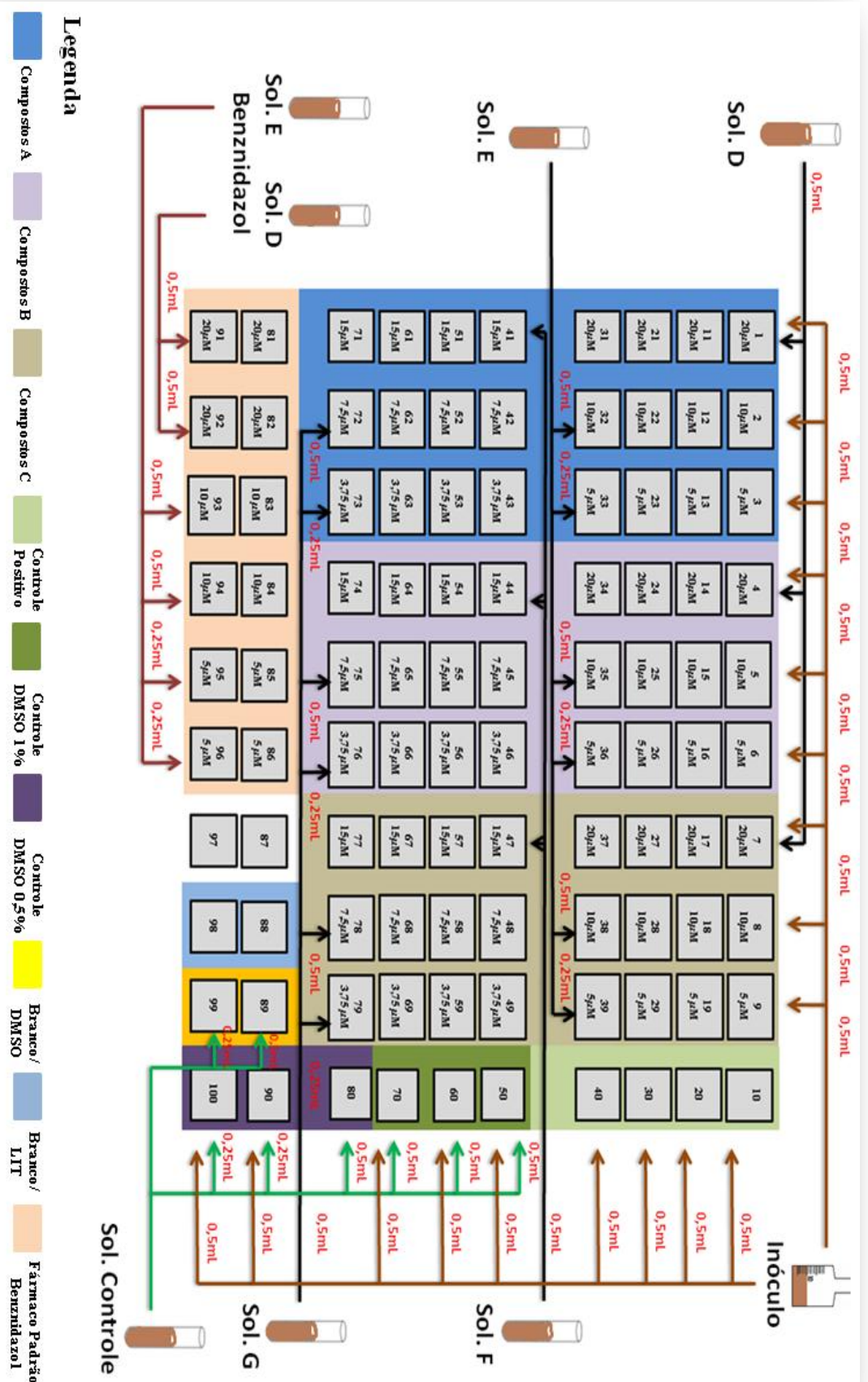


Figura 17: Ilustração da caixa de cubetas e procedimentos adotados para realização dos ensaios de determinação da atividade anti-*T. cruzi*.

4.1.4.2 DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

A capacidade de inibição de crescimento do parasita foi avaliada em UV em comprimento de onda de 580 nm. O crescimento do parasita foi acompanhado no primeiro e no quinto dias, através das medidas de absorbância. A porcentagem de inibição do crescimento (*percentage of growth inhibition* - PGI) foi calculada de acordo com a equação 14 (Cerecetto *et al.*, 1999; Aguirre *et al.*, 2002; Aguirre *et al.*, 2004; Aguirre *et al.*, 2005; Aran *et al.*, 2005; Gerpe *et al.*, 2010; Merlino *et al.*, 2010; Jorge, 2010).

$$PGI = \left\{ 1 - \left[\frac{A_5 - A_0}{A_C - A_{OC}} \right] \right\} \times 10 \quad \text{Equação 14}$$

Em que:

A_5 : a absorbância do inóculo no dia 5

A_0 : absorbância do cultivo logo após a adição do inóculo

A_C : cultura na ausência de qualquer composto (controle positivo) do quinto dia

A_{OC} : cultura na ausência de qualquer composto (controle positivo) no dia 0

Os valores de IC_{50} , bem como o coeficiente de correlação (r^2), foram obtidos utilizando o programa Origin 8.0, fazendo o uso de modelo sigmoidal dose-resposta para todos os compostos, exceto para o etoxi-derivado, já que o modelo que melhor se adequou ao comportamento dos pontos obtidos foi o modelo exponencial.

5 RESULTADOS

5.1 SÍNTESE E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

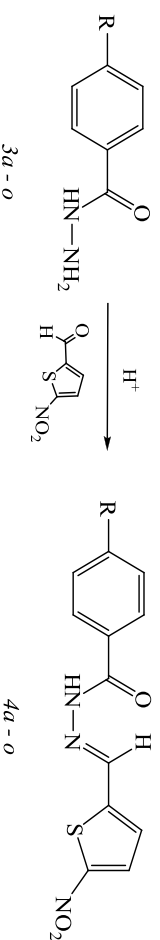
No presente trabalho foram sintetizados 11 compostos derivados 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas em que R foi igual a: Cl, Br, I, CH₃, C₂H₅, C₃H₉, OC₂H₅, OC₄H₉, CN, NO₂ e OCOCH₃. Para obtenção dos compostos finais foram realizadas quatro etapas: esterificação, amonólise, obtenção da base de Schiff e ciclização oxidativa. Ressalta-se que neste trabalho foram efetuadas as etapas de obtenção da base de Schiff e ciclização oxidativa. As benzidrazidas substituídas, empregadas na reação de obtenção da base de Schiff, foram sintetizadas e identificadas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos – FBT/FCF/USP, sob coordenação do Prof. Assoc. Leoberto Costa Tavares, e cedidas pelos seus autores para que viabilizassem a continuidade deste trabalho (Masunari, 2005; Almeida, 2009; Jorge, 2010).

5.1.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS

Nas tabelas 2 e 3 apresentam-se os resultados obtidos nas etapas de síntese das bases de Schiff e dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos.

5.1.2 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS

As tabelas 4 e 5 apresentam deslocamentos químicos obtidos dos espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C referentes às estruturas químicas dos compostos da série de derivados 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas. A tabela 6 apresenta os resultados obtidos na análise elementar CHN.

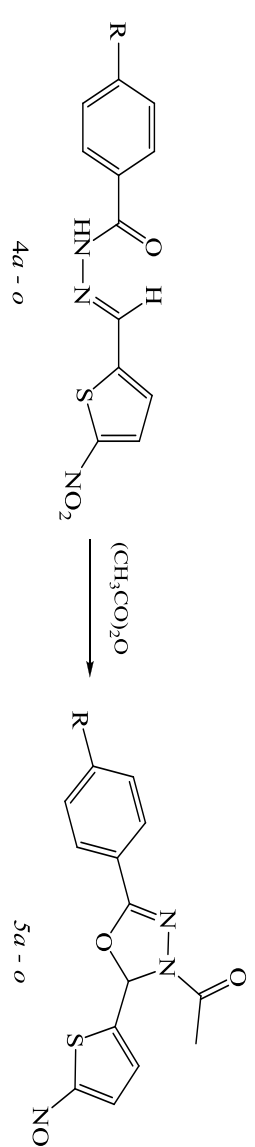
Tabela 2: Resultados obtidos e condições reacionais envolvidas na obtenção das bases de Schiff.

Composto	R	Material de Partida g - (mol)*	Massa de Aldeído g - (mol)**	Rendimento (η%)		Faixa de Fusão (°C)	
				Exp.	Lit.	Exp.	Lit.
4a	I	0,5 (0,0019)	0,29 (0,0019)	95	92	275,2-276,4	276,5-277,9 ^a
4b	Br	0,5 (0,0023)	0,36 (0,0023)	92	91	206,7-207,9	207,2-208,5 ^a
4c	Cl	0,5 (0,0029)	0,45 (0,0029)	91	93	291-292	287-290 ^e
4d	CN	0,5 (0,0031)	0,48 (0,0031)	80	87	224,3-225,3	224-226 ^e
4e	OC ₂ H ₅	0,5 (0,0014)	0,23 (0,0014)	77	-	-	-
4f	OC ₄ H ₉	0,5 (0,0024)	0,38 (0,0024)	99	96	202,2-203,1	200,8-201,5 ^c
4g	C ₂ H ₅	0,5 (0,0014)	0,23 (0,0014)	92	94	206,8-207,4	207,2-208,5 ^a
4h	C ₃ H ₇	0,5 (0,0028)	0,44 (0,0028)	90	88	252,1-252,9	251,3-252,7 ^a
4i	NO ₂	0,5 (0,0027)	0,42 (0,0027)	98	94	235,2-236,2	235-238 ^b
4j	OH	0,5 (0,0032)	0,50 (0,0032)	93	92	253,4-254,3	251-255 ^a

* Benzidrazidas substituídas.

**5-nitro-2-tiofenocarboxaldeído.

a: Masunari, 2005; **b:** Furlanetto, 2005; **c:** Rezende, 2002

Tabela 3: Resultados obtidos e condições reacionais envolvidas na obtenção dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos.


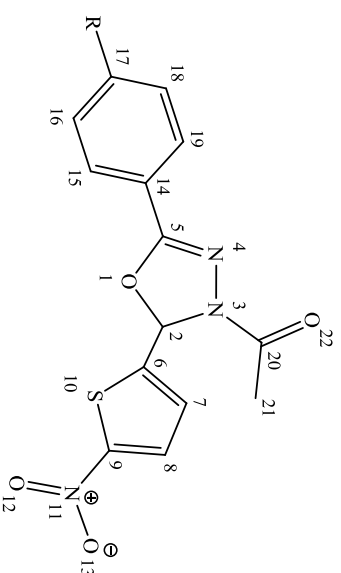
Composto	R	Material de Partida g (mol)*	Rendimento (η%)		Faixa de Fusão (°C)	
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.
5a	I	0,5 (0,0012)	55	55	156-157	156-157 ^a
5b	Br	0,5 (0,0014)	42	-	142-143	-
5c	Cl	0,5 (0,0016)	70	70	130-131	130-131 ^a
5d	CN	0,5 (0,0017)	53	-	136-137	-
5e	OC ₂ H ₅	0,5 (0,0016)	56	56	108-109	109-110 ^a
5f	OC ₄ H ₉	0,5 (0,0014)	53	-	115-116	-
5g	C ₂ H ₅	0,5 (0,0016)	55	62	106-107	108-109 ^a
5h	C ₃ H ₇	0,5 (0,0016)	48	65	74-75	73-74 ^a
5i	NO ₂	0,5 (0,0014)	57	-	186-187	-
5j	OCOCH ₃	0,5 (0,0017)	75	-	120-121	-
5k	OCH ₃	0,5 (0,0014)	45	51	112-113	109,5-111 ^a

*Material de Partida: Base de Schiff.

a: Almeida, 2009.

Nota: o volume de anidrido acético utilizado foi de 10 mL (0,11 mol).

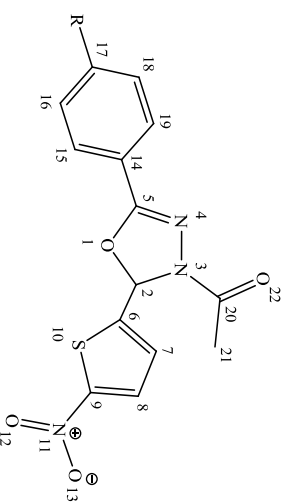
Tabela 4: Principais sinais de RMN ¹H em DMSO - d₆ (ppm) para a série 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituído]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolinas.



Composto	R	H ₂₂ (s,3H)	H ₇ (d, 1H)	J (Hz)	H ₂ (s, 1H)	H _{16/18} (d, 2H)	J (Hz)	H _{15/19} (d, 2H)	J (Hz)	H ₈ (d, 1H)	J (Hz)
<i>5a</i>	I	2,27	7,45	4,3	7,55	7,61	8,5	7,92	8,5	8,05	4,3
<i>5b</i>	Br	2,23	7,42	4,3	7,52	7,72	2,7	7,72	2,7	8,01	4,3
<i>5c</i>	Cl	2,27	7,46	4,3	7,56	7,60	8,6	7,85	8,6	8,05	4,3
<i>5d</i>	CN	2,32	7,51	4,2	7,62	8,02 ^s	-	8,08	4,2	8,02 ^s	-
<i>5e</i>	OC ₂ H ₅	2,21	7,38	4,3	7,46	7,00	8,9	7,72	8,9	7,99	4,3
<i>5f</i>	OC ₄ H ₉	2,25	7,42	4,3	7,51	7,06	8,9	7,77	8,9	8,04	4,3
<i>5g</i>	C ₂ H ₅	2,29	7,46	4,3	7,56	7,40	8,1	7,78	8,2	8,07	4,3
<i>5h</i>	C ₃ H ₇	2,28	7,46	4,2	7,55	7,36	7,3	7,77	7,4	8,06	4,3
<i>5i</i>	NO ₂	2,33	7,52	4,3	7,63	8,40	9,0	8,11	9,0	8,07	4,6
<i>5j</i>	OCOCH ₃	2,32	7,48	4,3	7,57	7,93	8,6	7,35	8,6	8,06	4,3
<i>5k</i>	OCH ₃	2,28	7,45	4,3	7,53	7,10	8,8	7,81	8,8	8,06	4,3

Nota: s: singleteo; d: dupleteo; t: tripleto; J: constante de acoplamento; RMN: DMSO – d₆ (300 MHz)

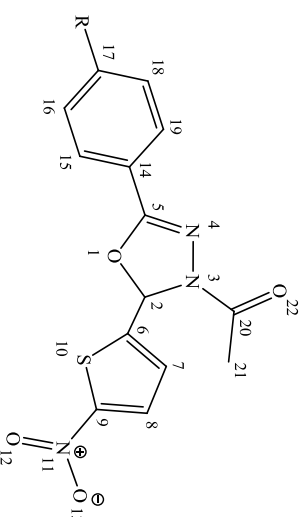
Tabela 5: Principais sinais de RMN ^{13}C em DMSO - d_6 (ppm) para a série 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituído]-2,3-dihidro-1,3,4-oxadiazolinas.



Composto	R	C ₂	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₄	C _{15/19}	C _{16/18}	C ₂₀	C ₂₂	C ₁₇
5a	I	87,6	154,6	152,2	100,3	123,3	147,0	130,0	128,8	127,7	167,9	21,5	138,5
5b	Br	87,7	154,3	152,2	126,3	127,7	147,0	130,0	129,0	132,8	167,9	21,5	123,0
5c	Cl	87,6	154,2	152,2	122,7	127,7	147,0	130,0	129,8	128,9	168,0	21,4	137,4
5d	CN	87,6	157,3	153,2	127,5	129,5	152,0	146,3	127,3	133,0	167,7	21,1	114,3
5e	OC ₂ H ₅	87,0	155,1	152,1	129,1	130,0	147,4	115,7	127,4	115,5	167,6	21,5	162,1
5f	OC ₄ H ₉	87,0	155,1	152,1	129,1	130,0	147,4	127,5	129,1	115,6	167,7	21,5	162,3
5g	C ₂ H ₅	86,6	154,6	151,6	120,7	127,0	148,5	129,4	128,5	126,7	167,2	21,0	146,8
5h	C ₃ H ₇	86,7	154,7	151,6	120,8	127,1	147,0	130,0	129,1	126,7	167,3	21,0	146,8
5i	NO ₂	87,8	153,0	152,2	127,2	128,0	149,4	129,3	127,2	124,1	167,7	21,0	146,2
5j	CO ₂ CH ₃	87,0	154,0	153,3	120,8	127,1	146,6	129,4	128,2	122,8	168,8	21,0	151,7
5k	OCH ₃	86,6	154,6	151,6	129,5	131,3	146,9	127,0	128,6	115,7	167,1	86,6	162,3

RMN: DMSO - d_6 (75 MHz)

Tabela 6: Análise Elementar CHN de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos.



Composto	R	Fórmula Molecular	Massa Molecular	%C			%H			%N		
				Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ
5a	I	C ₁₄ H ₁₀ IN ₃ O ₄ S	442,94	37,98	37,94	0,04	2,19	2,27	0,08	9,47	9,48	0,02
5b	Br	C ₁₄ H ₁₀ BrN ₃ O ₄ S	394,96	42,44	42,44	0,00	2,50	2,54	0,04	10,60	10,61	0,01
5c	Cl	C ₁₄ H ₁₀ ClN ₃ O ₄ S	351,01	48,01	47,80	0,21	2,78	2,87	0,09	11,93	11,95	0,02
5d	CN	C ₁₅ H ₁₀ N ₄ O ₄ S	342,04	49,76	52,63	2,87	3,54	2,94	0,60	15,83	16,37	0,54
5e	OC ₂ H ₅	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₅ S	361,07	53,42	53,18	0,24	3,85	4,18	0,33	11,70	11,63	0,07
5f	OC ₄ H ₉	C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	389,43	56,07	55,52	0,55	4,80	4,92	0,13	11,09	10,79	0,30
5g	C ₂ H ₅	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₄ S	345,08	55,74	55,64	0,09	4,45	4,38	0,07	12,10	12,17	0,08
5h	C ₃ H ₇	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ O ₄ S	359,09	56,33	56,81	0,48	4,75	4,77	0,02	11,88	11,69	0,19
5i	NO ₂	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₆ S	362,03	46,50	46,41	0,09	2,76	2,78	0,02	15,30	15,46	0,16
5j	CO ₂ CH ₃	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₆ S	375,05	51,10	51,20	0,11	3,55	3,49	0,05	11,06	11,19	0,14
5k	OCH ₃	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₅ S	347,06	51,80	57,87	0,07	3,85	3,77	0,08	12,05	12,10	0,05

Nota: Δ = |% experimental – % calculada|

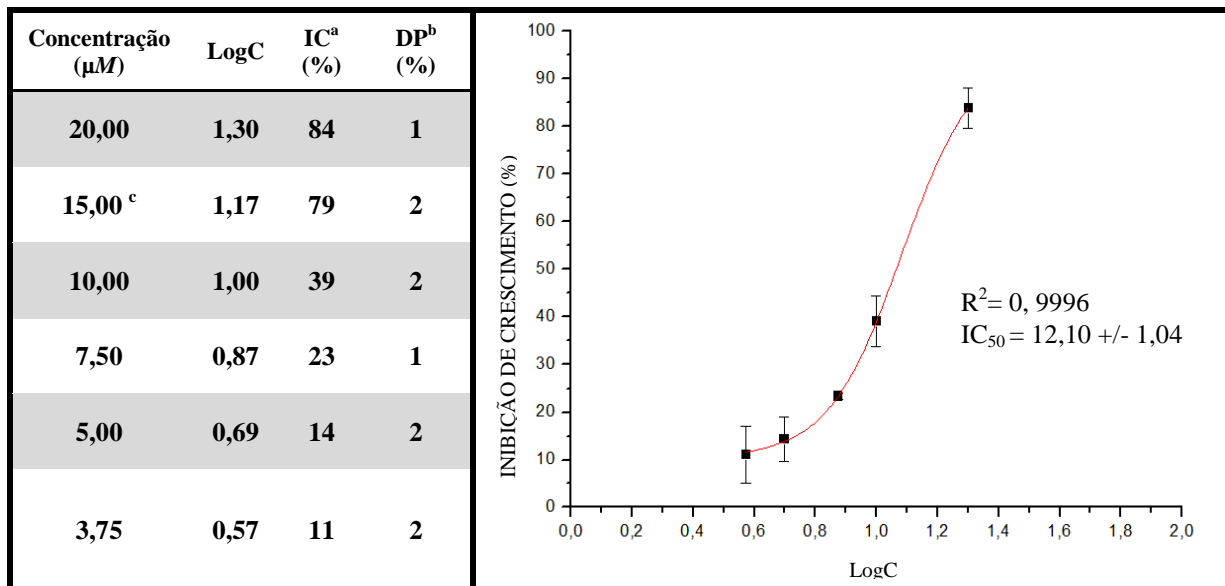
5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*T. cruzi*

No presente trabalho foi determinada a atividade anti-*T. cruzi* de 15 compostos, referentes à série 1,3,4-oxadiazolínico, dos quais 4 compostos (OC₃H₇, CF₃, H e CH₃) encontravam-se disponíveis, uma vez que foram previamente sintetizados e identificados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos – FBT/FCF/USP. Os ensaios de atividade anti-*T. cruzi* foram determinados *in vitro* (seguindo metodologia descrita no **item 4.1.4**).

Para a determinação do valor da concentração inibitória de crescimento de 50% das formas epimastigotas (IC₅₀), todos os compostos foram avaliados em triplicata, utilizando 6 diluições diferentes, entre 3,75 e 20 μ M. Este intervalo de concentração foi escolhido devido ao fato de nitrocompostos apresentarem baixa solubilidade em meio LIT. Todos os valores de concentração (μ M) obtidos foram convertidos em Log(1/C) e correlacionados com o percentual de inibição de crescimento. Aplicando o programa OriginPro 8.0, foram determinados valores de IC₅₀, desvio padrão (DP) e coeficiente de determinação (r^2). Os gráficos obtidos para a série em estudo e o fármaco padrão utilizado nos ensaios estão dispostos nas tabelas 7 a 22. Os valores de IC₅₀ e de potência dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos e do benznidazol encontram-se na tabela 23.

Tabela 7: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-**iodo**]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

4-Iodo (5a)



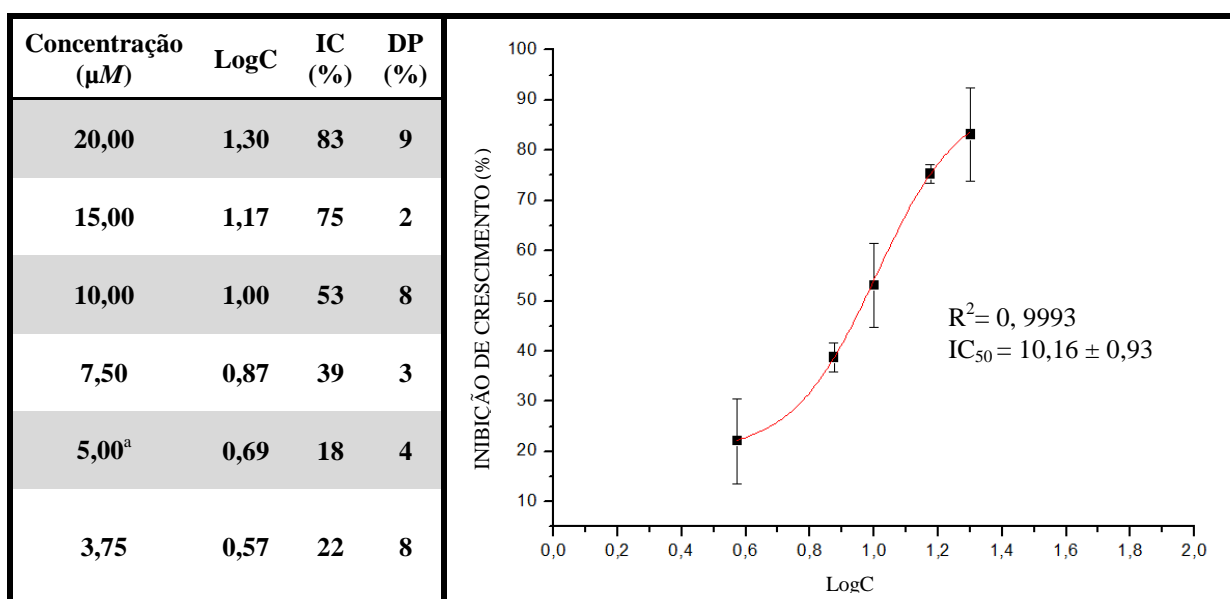
a: concentração inibitória

b: desvio padrão

c: valor retirado da regressão

Tabela 8: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-**bromo**]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

4-Bromo (5b)



a: valor retirado da regressão

Tabela 9: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-cloro]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

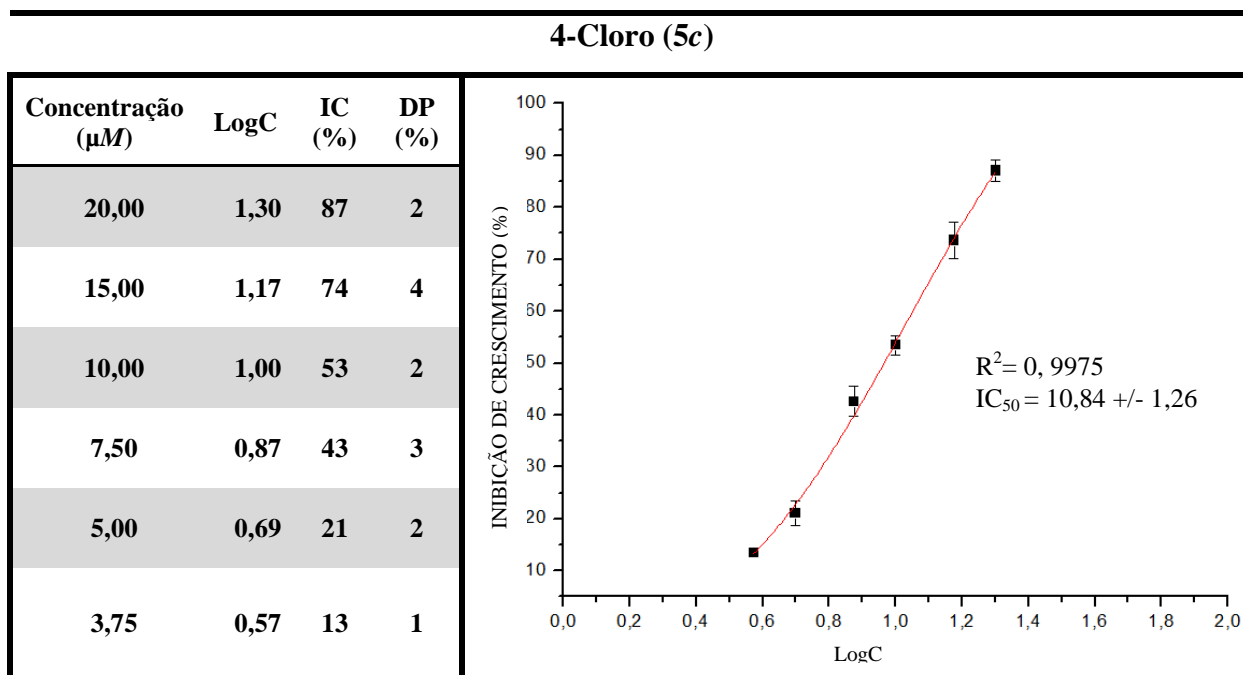
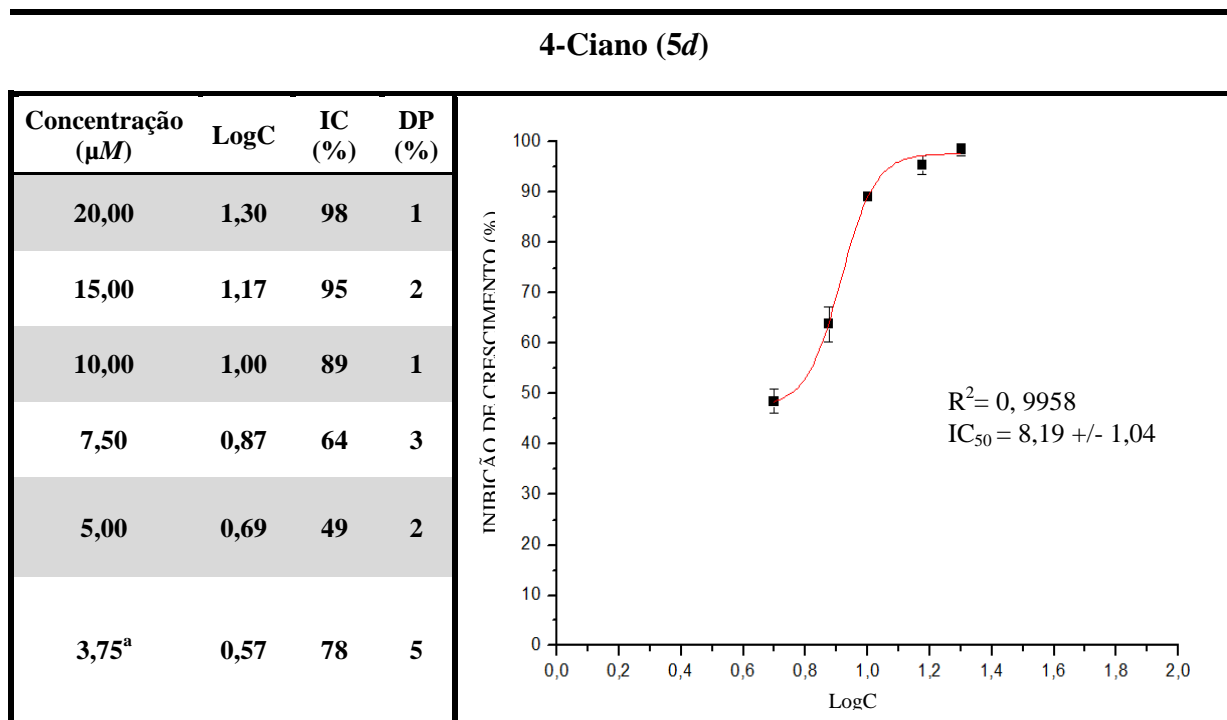


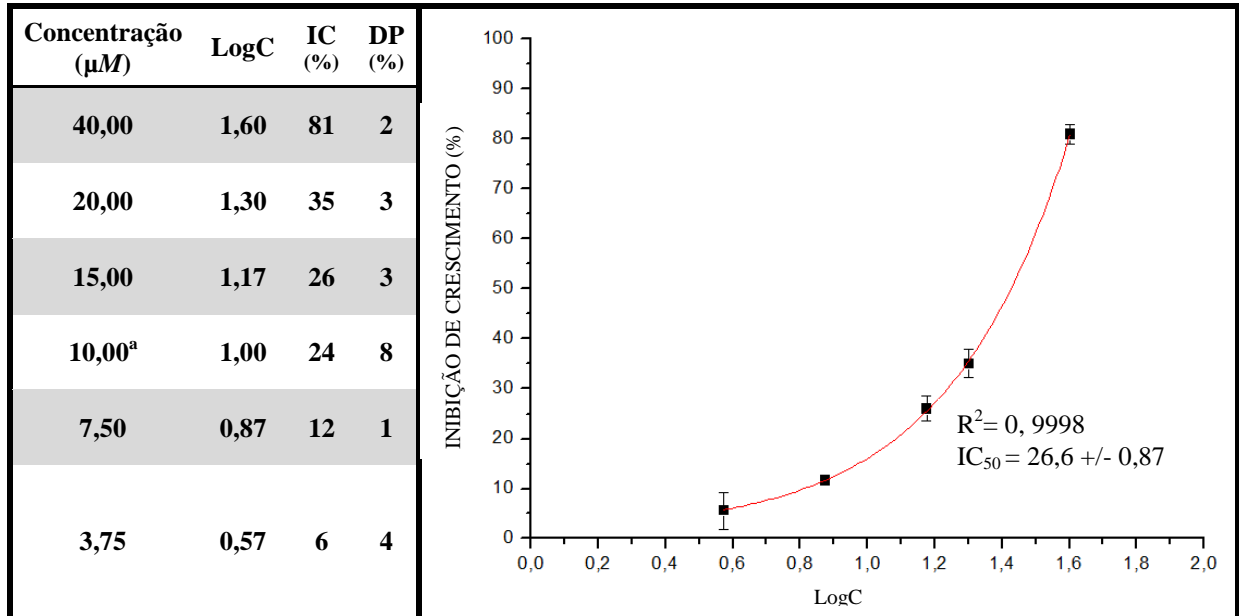
Tabela 10: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-ciano]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.



a: valor retirado da regressão

Tabela 11: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-**etoxi**]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

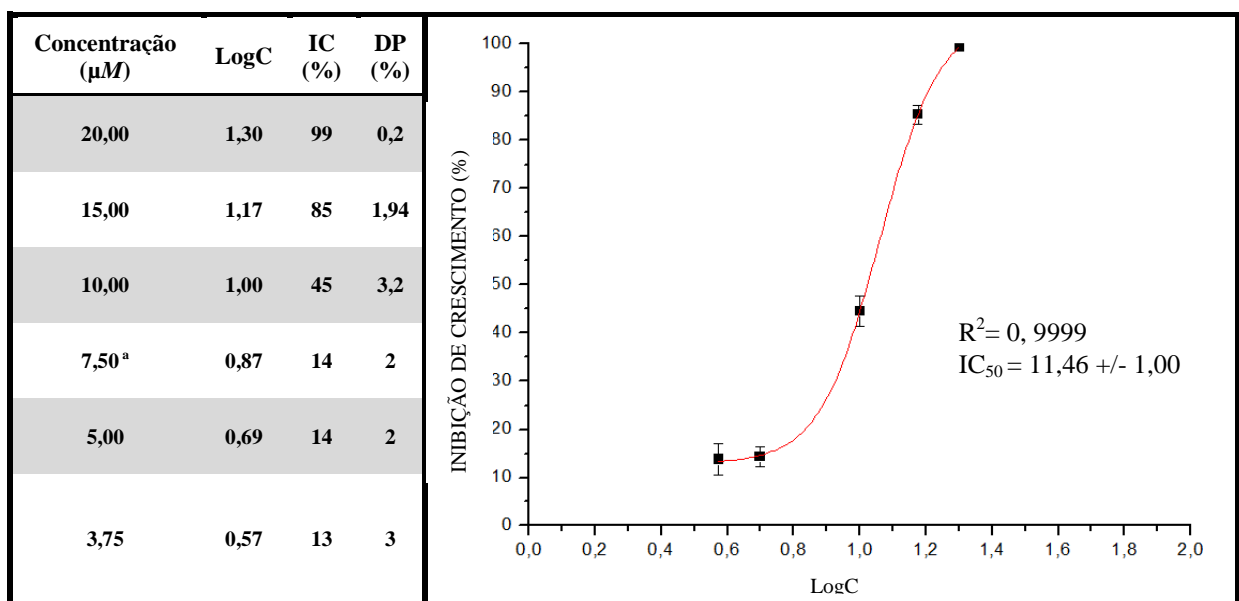
4-Etoxi (5e)



a: valor retirado da regressão

Tabela 12: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-**butoxi**]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

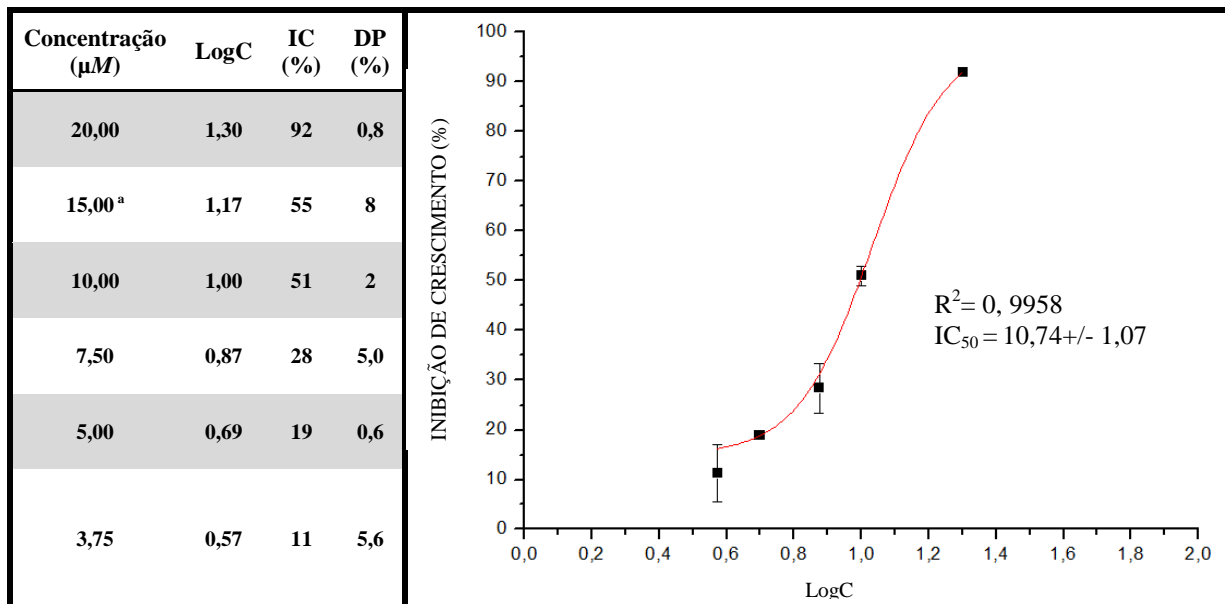
4-BUTOXI (5f)



a: valor retirado da regressão

Tabela 13: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-**etil**]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

4-ETIL (5g)



a: valor retirado da regressão

Tabela 14: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-**propil**]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

4-Propil (5h)

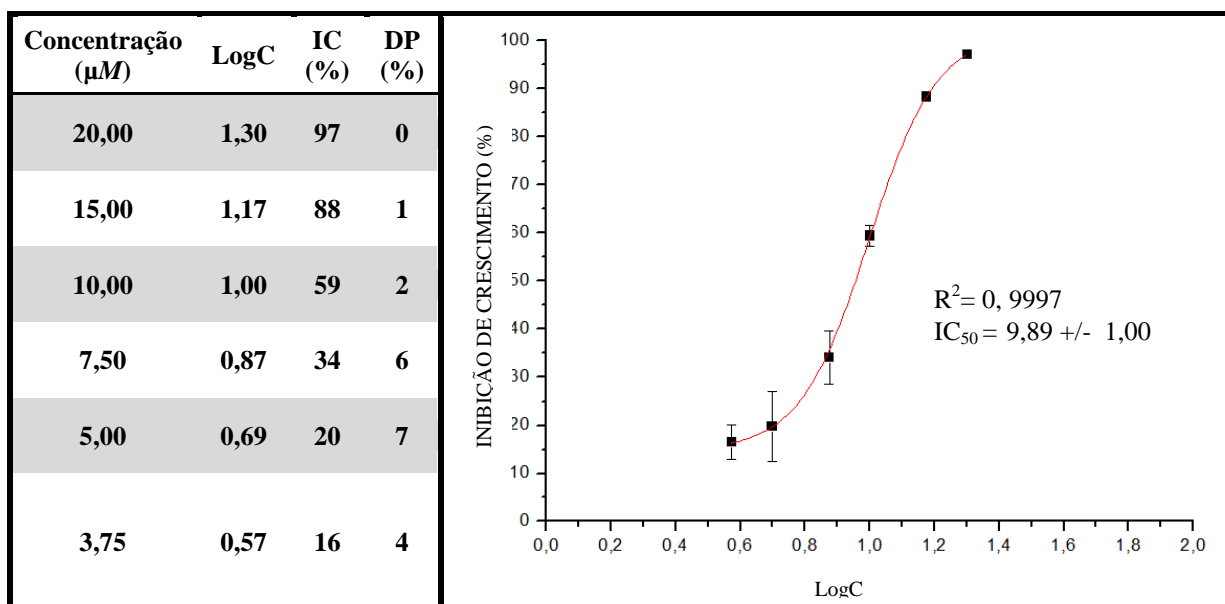
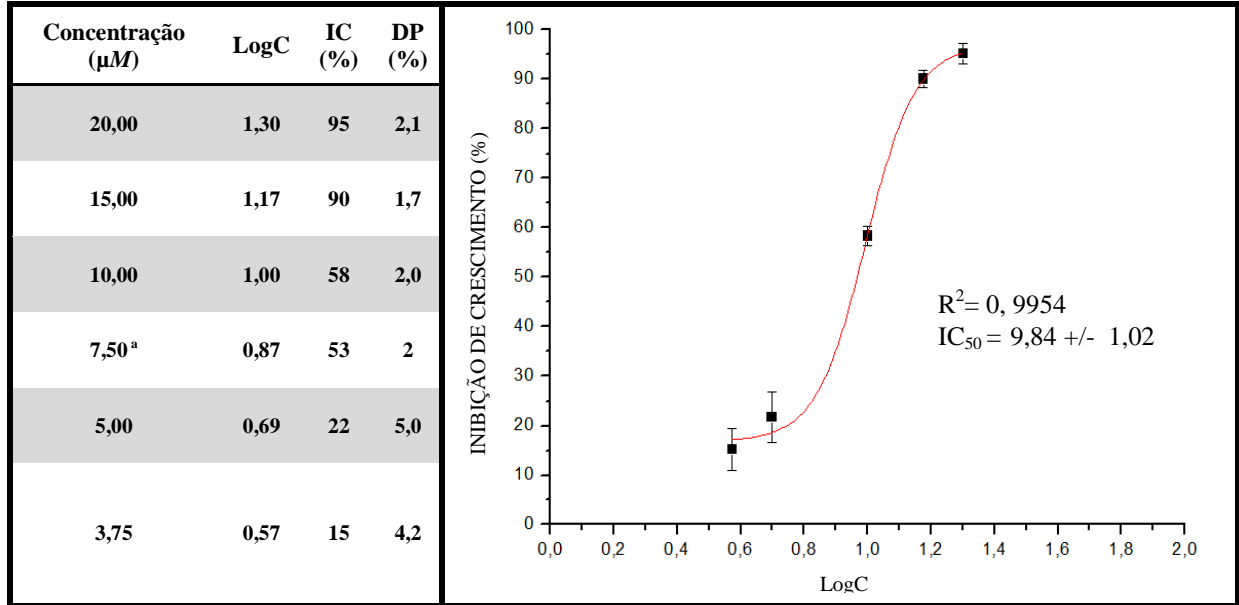


Tabela 15: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-nitro]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

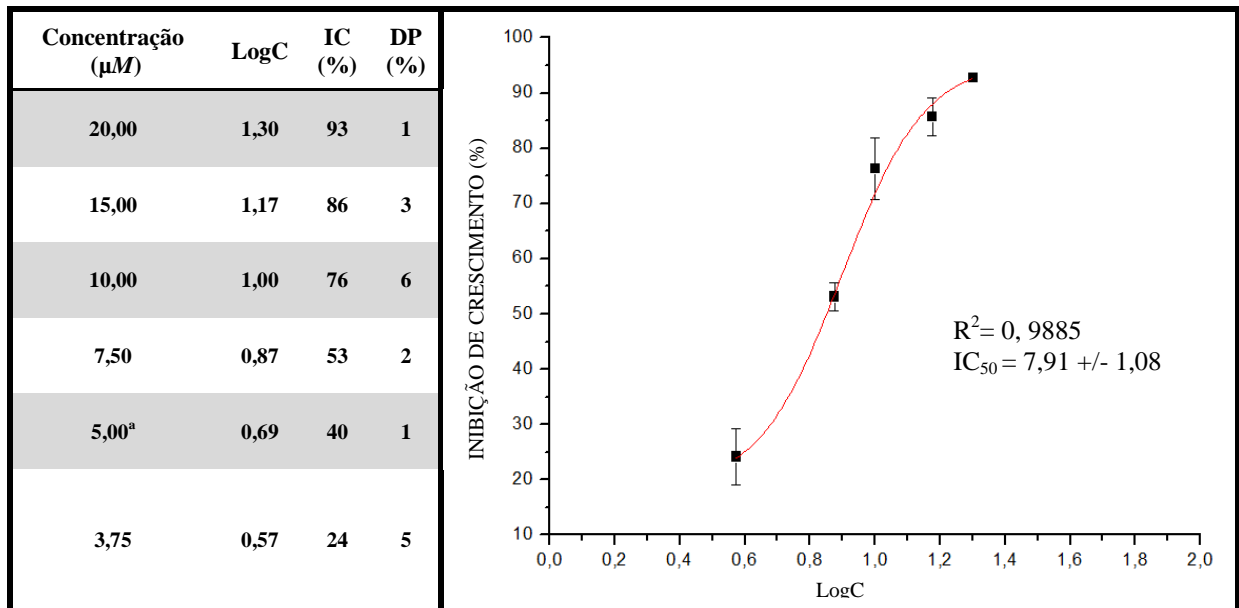
4-NITRO (5i)



a: valor retirado da regressão

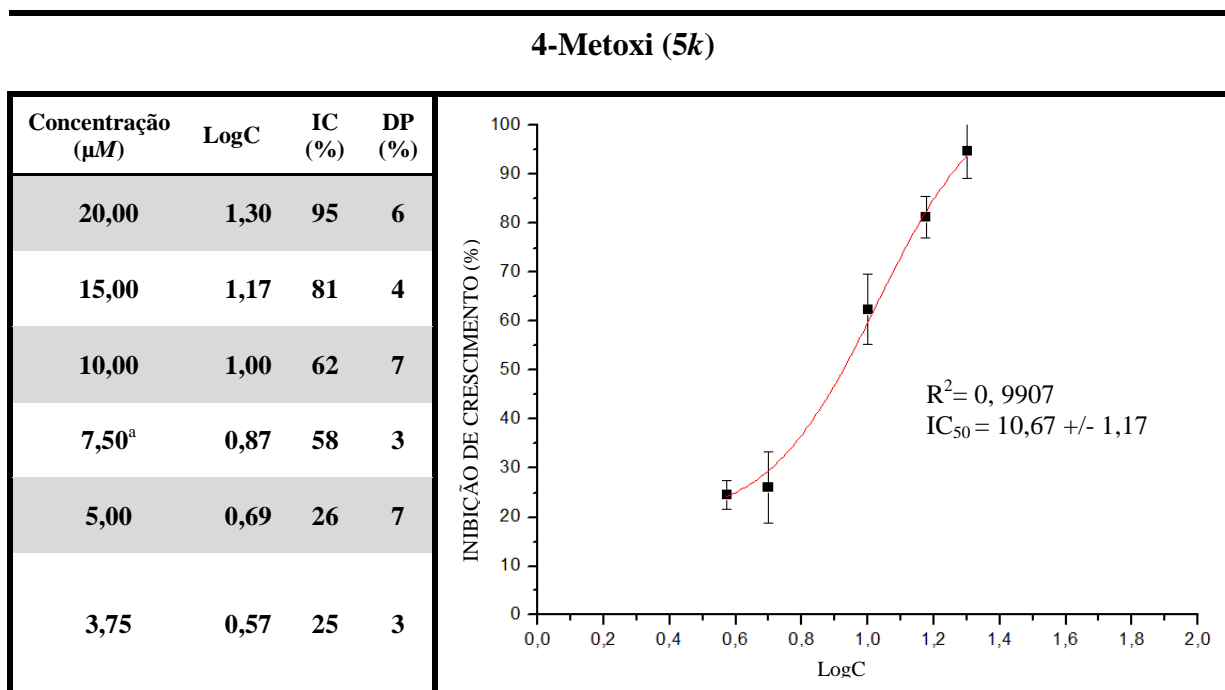
Tabela 16: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-acetoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

4-ACETOXI (5j)



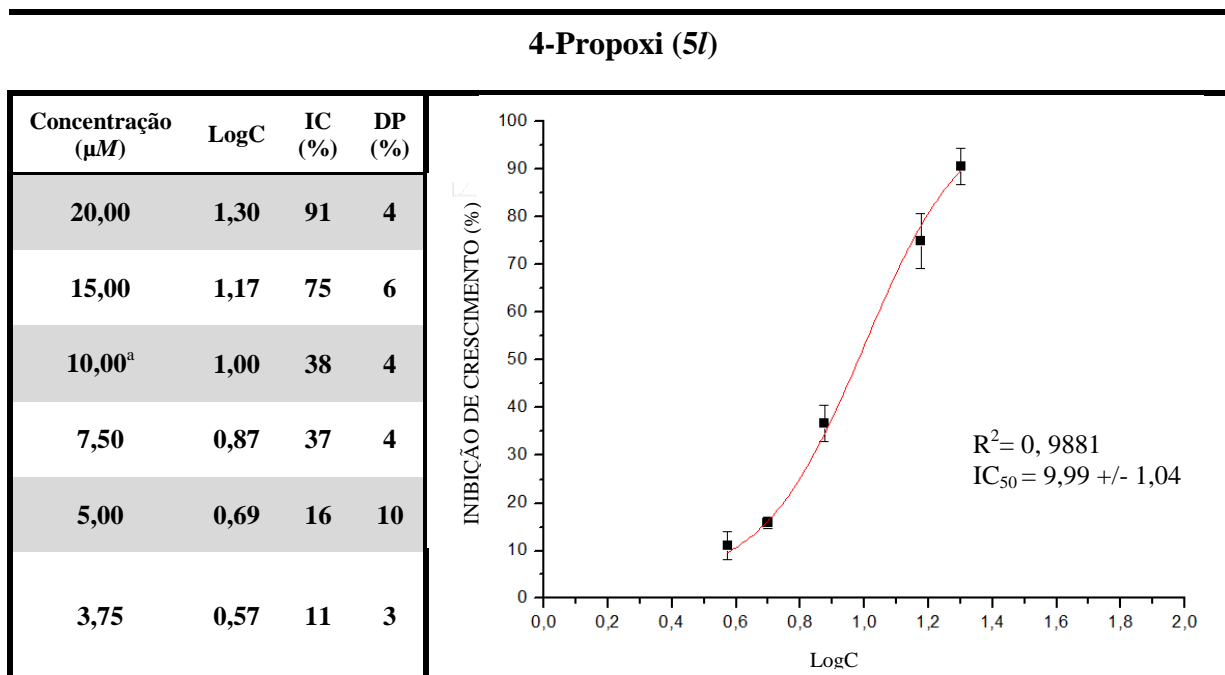
a: valor retirado da regressão

Tabela 17: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-**metoxi**]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.



a: valor retirado da regressão

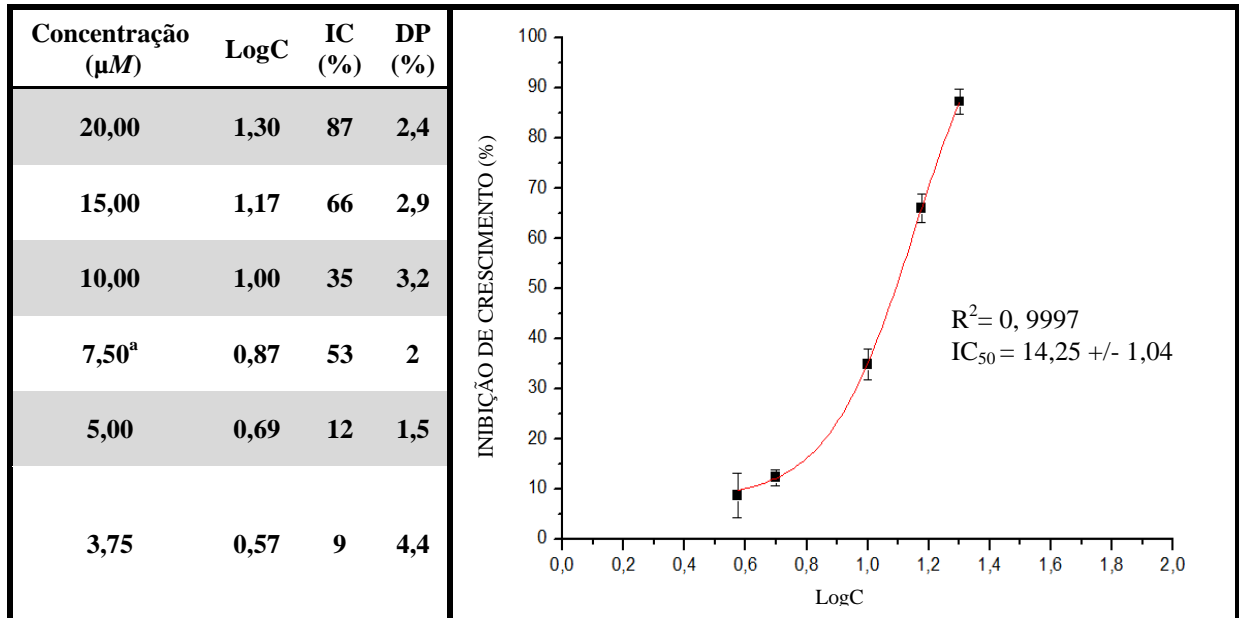
Tabela 18: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-**propoxi**]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.



a: valor retirado da regressão

Tabela 19: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-trifluórmetil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

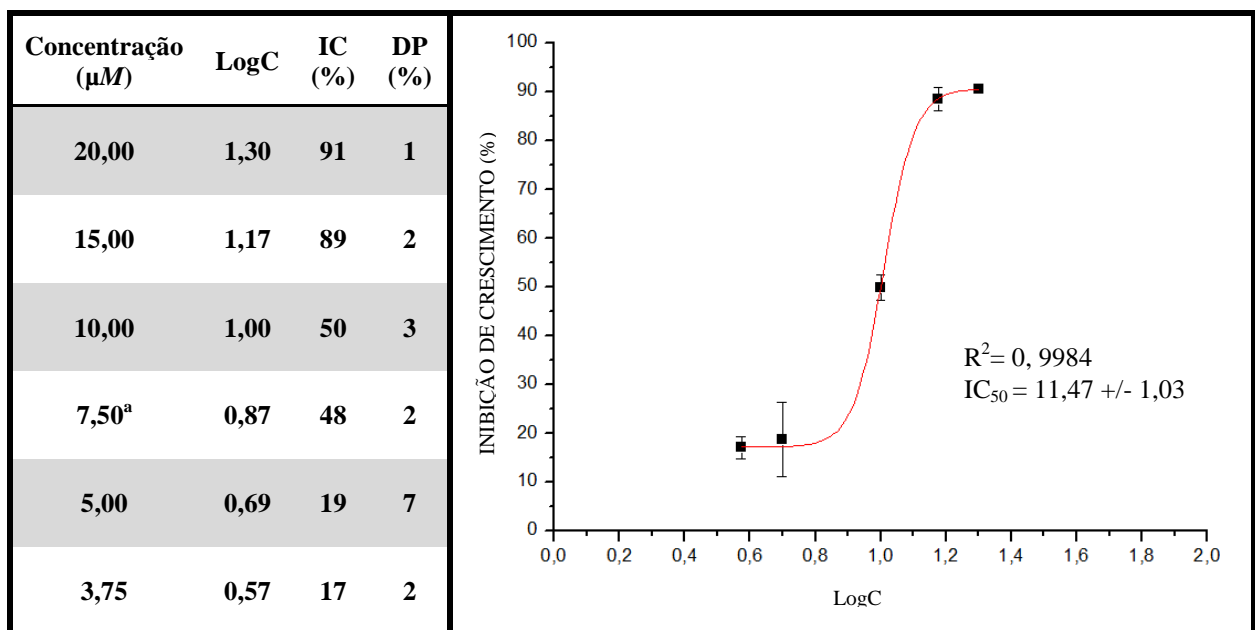
4-TRIFLÚOR METIL (5m)



a: valor retirado da regressão

Tabela 20: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-hidrogênio]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

4-Hidrogênio (5n)



a: valor retirado da regressão

Tabela 21: Curva dose resposta para o composto 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-metil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

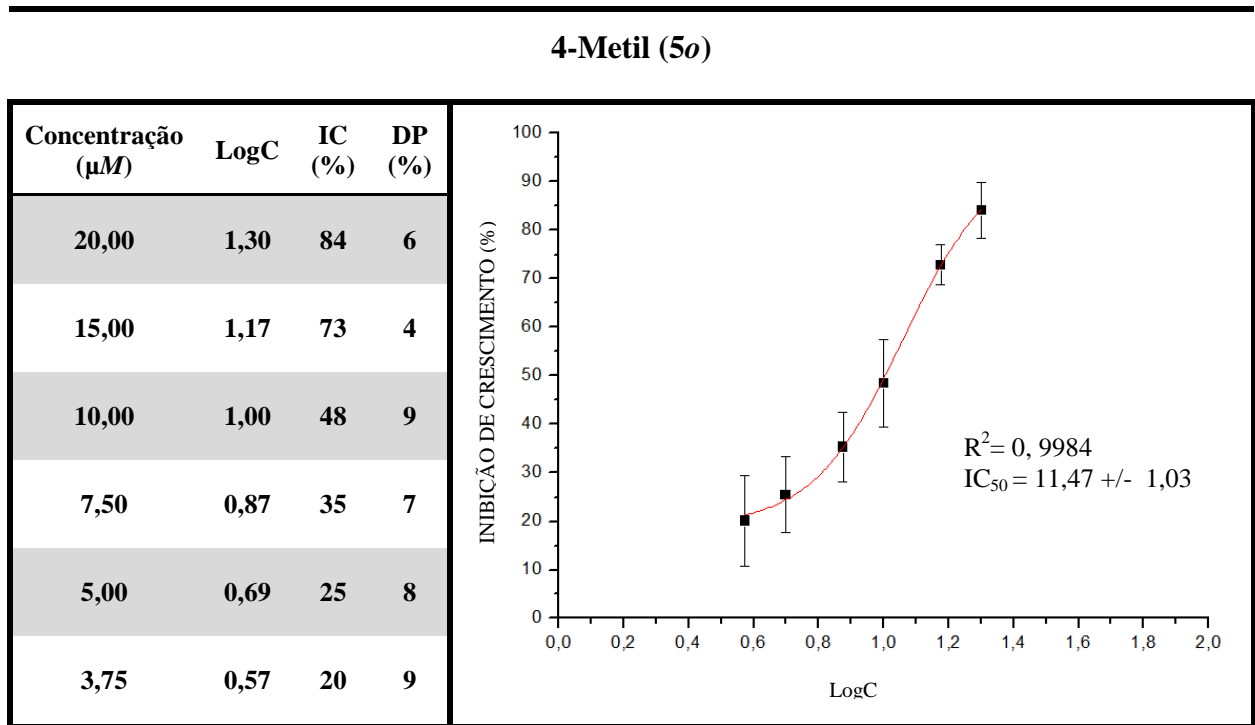
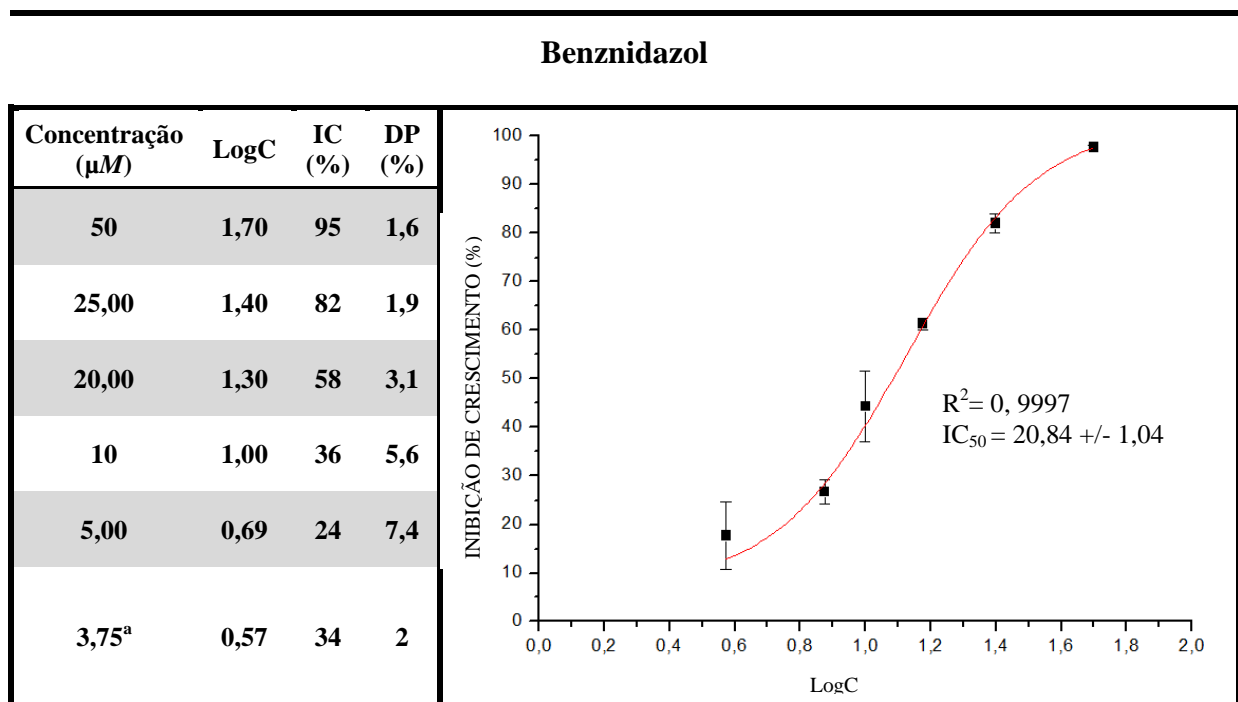
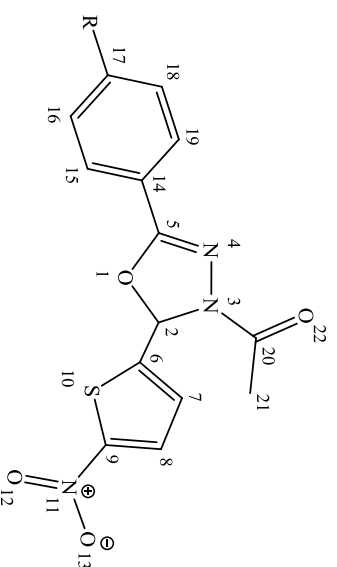


Tabela 22: Curva dose resposta para o fármaco utilizado como padrão.



a: valor retirado da regressão

Tabela 23: Avaliação da atividade anti-*T. cruzi* 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituído]-2,3-ditido-1,3,4-oxadiazolinas.

Composto	R	IC ₅₀	Potência Log(1/C)	Composto	R	IC ₅₀	Potência Log(1/C)
5a	I	12,10	4,92	5h	C₃H₉	9,89	5,00
5b	Br	10,16	4,99	5i	NO₂	9,84	5,01
5c	Cl	10,84	4,97	5j	OCOCH₃	7,91	5,10
5d	CN	8,19	5,09	5k	OCH₃	10,67	4,97
5e	OC₂H₅	26,60	4,58	5l	OC₃H₇	9,99	5,00
5f	OC₄H₉	11,46	4,94	5m	CF₃	14,25	4,85
5g	C₂H₅	10,74	4,97	5n	H	10,24	4,99
Padrão	BZD	20,84	4,68	5o	CH₃	11,47	4,94

5.3 ANÁLISE DE HANSCH

Os estudos de relação estrutura atividade em duas dimensões, referentes aos quinze derivados 1,3,4-oxadiazolínicos avaliados frente ao *T. cruzi*, foram efetuados utilizando o programa *BuildQSAR*. Os valores de IC_{50} obtidos foram convertidos em potência $\text{Log}(1/IC_{50})$, sendo que os valores de IC_{50} obtidos foram determinados em μM .

Para melhor compreender as influências das propriedades hidrofóbicas, eletrônicas e estereoequímicas, foram empregados os descritores apresentados abaixo:

Descritores hidrofóbicos: constante de hidrofobicidade de Hansch (π) e logaritmo do coeficiente de partição - LogP

Descritores eletrônicos: constante de efeito eletrônico de Hammett (σ), constante de Swain (τ) e constante de Lupton (ϵ)

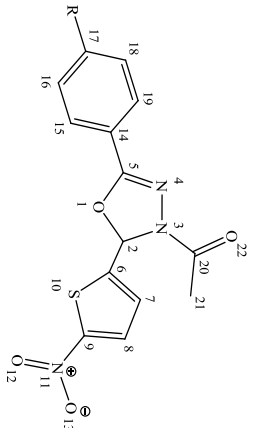
Descritores estereoequímicos: parâmetros de Verloop (L, B1, B2, B3 e B4) e refratividade molar (MR), descritor de caráter misto.

A variável dependente foi correlacionada com os descritores estruturais relacionados com cada propriedade físico-química, empregando-se os modelos linear, parabólico e bilinear, obtendo-se, assim, diversas regressões que foram avaliadas mediante seus respectivos parâmetros estatísticos.

As melhores regressões selecionadas foram as que apresentaram valor de coeficiente de correlação, r^2 , maior que 0,9, desvio padrão, s , menor que o desvio padrão obtido na avaliação biológica e nível de significância da equação, F , Fisher, que apresentou nível de significância superior a 95%. Outro fator relevante para validar uma determinada regressão, consistiu em selecionar equações que apresentaram variabilidade do coeficiente do descritor, menor que o próprio coeficiente correspondente (Kubinyi, 1993).

Com o intuito de melhor compreender a real contribuição das propriedades hidrofóbicas, eletrônicas e estereoequímicas, utilizaram-se os parâmetros apresentados na tabela 24. Para obtenção das regressões fez-se o uso dos modelos linear, parabólico e bilinear, correlacionando os parâmetros da tabela com a atividade biológica.

Tabela 24: Atividade anti-*T. cruzi* e descritores estruturais relacionados aos efeitos hidrofóbicos, eletrônicos e estereoquímicos de grupos substituintes utilizados na análise de QSAR-2D da série de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos



R	Composto	Potência	π^a	σ^a	ζ^b	η^b	ClogP ^c	MR ^a	L ^b	B1 ^b	B2 ^b	B3 ^b	B4 ^b
I	5a	4,92	1,12	0,18	0,42	-0,24	3,842	1,394	4,23	2,15	2,15	2,15	2,15
Br	5b	4,99	0,86	0,23	0,45	-0,22	3,582	0,888	3,83	1,95	1,95	1,95	1,95
Cl	5c	4,97	0,71	0,23	0,42	-0,19	3,432	0,603	3,52	1,80	1,80	1,80	1,80
CN	5d	5,09	-0,57	0,66	0,51	0,15	2,152	0,633	4,23	1,60	1,60	1,60	1,60
OC ₂ H ₅	5e	4,58	0,38	-0,24	0,26	-0,50	3,167	1,247	4,92	1,35	3,36	1,35	1,90
OC ₄ H ₉	5f	4,94	1,55	-0,32	0,29	-0,61	4,225	2,166	6,99	1,35	4,79	1,90	1,90
C ₂ H ₅	5g	4,97	1,02	-0,15	0,00	-0,15	3,747	1,03	4,11	1,52	2,97	1,90	1,90
C ₃ H ₇	5h	5,00	1,55	-0,13	0,01	-0,14	4,276	1,496	5,05	1,52	3,49	1,90	1,90
NO ₂	5i	5,01	-0,28	0,78	0,65	0,13	2,462	0,736	3,44	1,70	1,70	2,44	2,44
OCOCH ₃	5j	5,10	-0,64	0,31	0,34	0,11	2,068	1,289	4,87	1,35	3,68	1,90	1,90
OCH ₃	5k	4,97	-0,02	-0,27	0,29	-0,56	2,638	0,787	3,98	1,35	2,87	1,90	1,90
OC ₃ H ₇	5l	5,00	0,85	-0,25	0,26	0,51	3,696	1,706	6,05	1,35	4,30	1,90	1,90
CF ₃	5m	4,85	0,88	0,54	0,38	0,16	3,602	0,502	3,30	1,98	2,61	2,44	2,44
H	5n	4,99	0,00	0,00	0,00	0,00	1,572	0,103	2,06	1,00	1,00	1,00	1,00
CH ₃	5o	4,94	0,56	-0,17	0,01	-0,18	2,764	0,565	3,00	1,52	2,04	1,90	1,90

a: Hansch, Leo, Hoekman, 1995a / b: Hansch, Leo, Hoekman, 1995b / c: ClogP calculado pelo programa Chem biodraw Ultra, versão 11.0

Para estudos de QSAR, deve-se obedecer a relação de 1 parâmetro analisado para cada 5 dados de atividade. A tabela 25 é constituída de 11 descritores, referentes às propriedades físico-químicas que se deseja avaliar. Para que não ocorresse a possibilidade de gerar modelos superajustados, devido à seleção de variáveis independentes altamente correlacionadas, obteve-se uma matriz de correlação dos descritores. Para seleção das variáveis para construção dos modelos, optou-se por utilizar variáveis que apresentaram índice de correlação inferior a 0,7. A tabela 25 apresenta os resultados obtidos da matriz de correlação dos descritores.

Tabela 25: Matriz de correlação dos descritores utilizados nos estudos de QSAR

	π	σ	\mathfrak{S}	\mathfrak{R}	ClogP	MR	L	B1	B2	B3	B4
π	1,000	0,245	0,122	0,089	0,854	0,262	0,149	0,820	0,171	0,490	0,460
σ		1,000	0,512	0,245	0,133	0,208	0,166	0,264	0,310	0,158	0,104
\mathfrak{S}			1,000	0,240	0,009	0,000	0,004	0,292	0,340	0,217	0,242
\mathfrak{R}				1,000	0,063	0,041	0,220	0,003	0,022	0,033	0,002
ClogP					1,000	0,418	0,312	0,186	0,293	0,173	0,207
MR						1,000	0,908	0,003	0,768	0,034	0,064
L							1,000	0,022	0,814	0,013	0,035
B1								1,000	0,077	0,467	0,436
B2									1,000	0,022	0,056
B3										1,000	0,847
B4											1,000

A melhor correlação obtida foi a que empregou o modelo parabólico, associando o seguinte par de descritores com a atividade biológica: π x \mathfrak{R} . Abaixo, apresenta-se a equação 15, que foi a melhor correlação obtida entre as propriedades físico-químicas e a atividade anti-*T. cruzi* para a série dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos.

Modelo Parabólico

$$\pi \times \mathfrak{R}$$

$$\text{Log}(1/C) = + 0,056 (\pm 0,033) \pi^2 - 0,089 (\pm 0,036) \pi + 0,069 (\pm 0,056) \mathfrak{R} + 5,001 (\pm 0,021)$$

(n = 013; r = 0,921; s = 0,024; F = 16,888) π ótimo = - 0,798 Equação 15c

6 DISCUSSÃO

6.1. PLANEJAMENTO E SÍNTESE DOS COMPOSTOS

Para obtenção dos compostos de interesse utilizados neste estudo, foi necessário o emprego de 4 etapas sintéticas, a saber: esterificação, amonólise, obtenção da base de Schiff e ciclização oxidativa, totalizando, assim, a síntese de 22 compostos, incluindo intermediários e compostos finais. Os compostos obtidos para a série de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos foram planejados de acordo com o diagrama de Craig (1971), porém, devido à necessidade do uso de grupos protetores para a síntese dos substituintes do terceiro quadrante, os mesmos não foram obtidos. A figura 18 apresenta a dispersão dos compostos finais obtidos de acordo com as suas propriedades eletrônicas (σ) e hidrofóbicas (π).

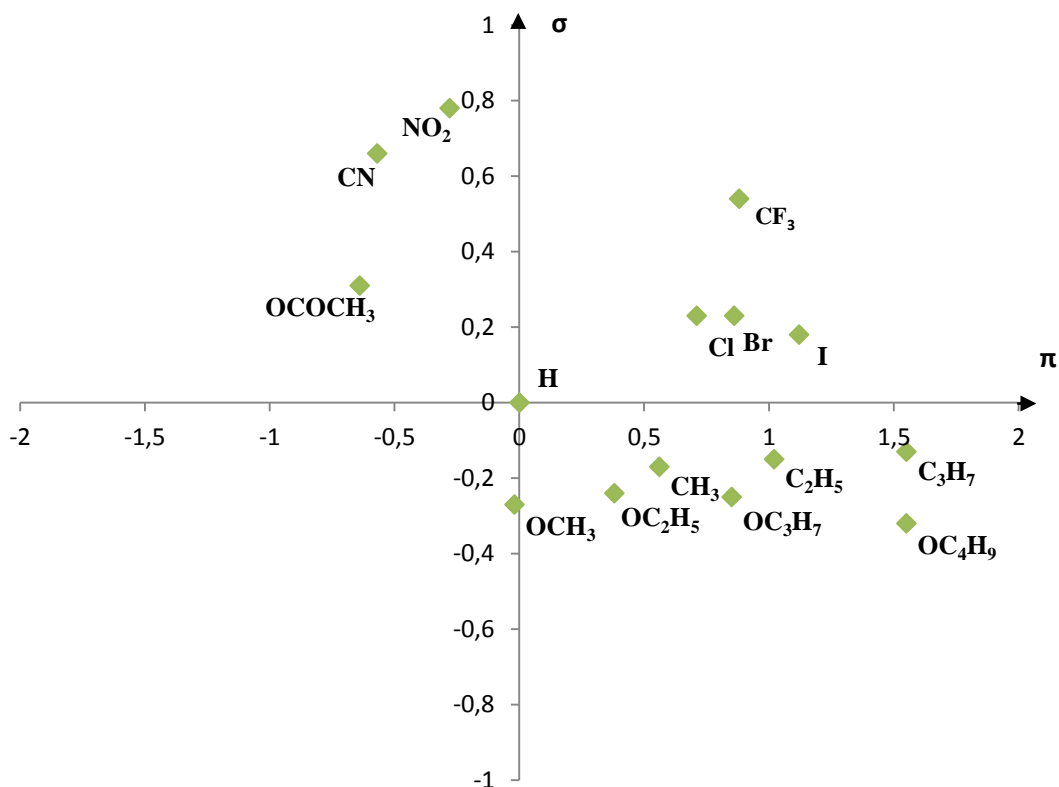


Figura 18: Diagrama de Craig (1971) apresentando a dispersão dos substituintes obtidos.

A grande parte dos substituintes selecionados concentra-se no quarto quadrante. Com o objetivo de melhor compreender a influência da variação da hidrofobicidade (π), a escolha dos substituintes do quarto quadrante teve como critério a seleção dos grupos nas proximidades de uma linha imaginária paralela ao eixo das abscissas (π), de forma que houvesse a mínima variação do efeito eletrônico (σ).

6.1.1 OBTENÇÃO DAS BASES DE SCHIFF

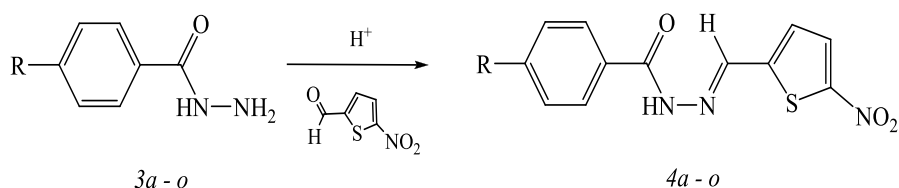


Figura 19: Etapa de obtenção das bases de Schiff substituídas.

O grupo carbonila C=O é o responsável pelo comportamento químico de aldeídos e cetonas. A reação de obtenção das bases de Schiff, iminas, consiste na reação de um composto carbonílico, 5-nitro-2-tiofenocarboxaldeído, e uma amina, benzidrazida substituída, em condições apropriadas, que é característico das reações de adição nucleofílica (Morrison, Boyd, 1994).

Os elétrons π de maior mobilidade são fortemente atraídos para o átomo de oxigênio, tornando o átomo de carbono carbonílico com baixa densidade eletrônica, o que propicia o ataque nucleofílico da base. Por outro lado, o átomo de oxigênio carbonílico apresenta alta densidade eletrônica, o que facilita a sua protonação quando em presença de meio ácido (Morrison, Boyd, 1994).

Para obtenção das bases de Schiff, como já exposto, inicialmente ocorre a protonação do oxigênio carbonílico, tornando o carbono carbonílico mais suscetível ao ataque nucleofílico da benzidrazida; formando-se assim, logo após o ataque, o intermediário tetraédrico. Por fim, ocorre a eliminação de uma molécula de água deste intermediário e de um próton, referente ao catalisador, que foi restituído ao final da reação (Morrison, Boyd, 1997; Clayden, Warren, Greeves, 2000). Na figura 20, ilustra-se o mecanismo proposto para obtenção das bases de Schiff.

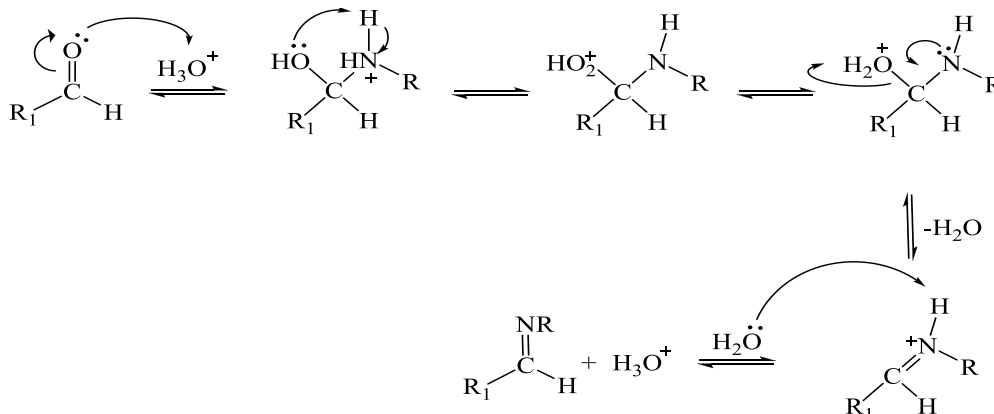


Figura 20: Mecanismos proposto para formação das bases de Schiff substituídas.

A catálise ácida foi crucial para reação de obtenção das iminas, caso contrário, a reação, além de se tornar muito lenta, poderia resultar em produtos secundários. A formação da imina ocorre mais rapidamente com o pH situado na faixa entre 4 e 6 (Clayden, Warren, Greeves, 2000). Em pH mais baixos, os nucleófilos (amina) são fortemente protonados, sendo a taxa de formação do produto muito lenta. Por outro lado, acima dessa faixa de pH, a concentração de prótons é muito baixa, não permitindo a protonação do oxigênio carbonílico e, assim, não promovendo a eliminação de uma molécula de água. A protonação do oxigênio carbonílico é responsável por diminuir a energia de ativação para o ataque nucleofílico, permitindo, assim, o oxigênio adquirir elétrons PI, sem ter uma carga negativa (Morrison, Boyd, 1997).

As bases de Schiff formaram-se imediatamente após a adição das benzidrazidas substituídas, apresentando coloração amarelada. A identificação das bases de Schiff obtidas foi realizada mediante a comparação da faixa de fusão determinada experimentalmente com dados da literatura. O rendimento médio obtido ao final desta etapa reacional foi de 91%.

6.1.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS 1,3,4-OXADIAZOLÍNICOS

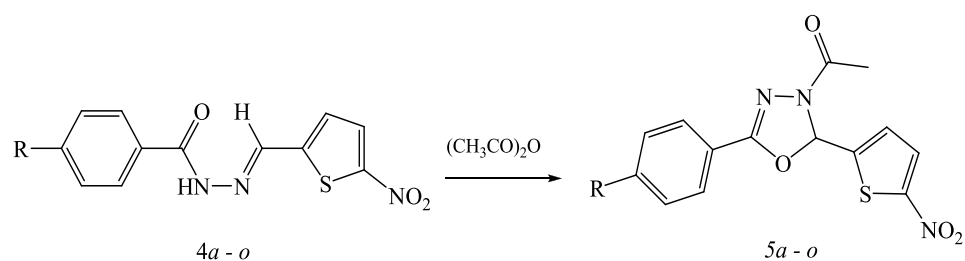


Figura 21: Etapa de obtenção dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos.

A obtenção dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos constitui-se de uma reação entre as bases de Schiff e anidrido acético. O mecanismo proposto para esta reação baseia-se primeiramente no ataque nucleofílico dos pares eletrônicos do nitrogênio imínico da base de Schiff a uma das carbonilas do anidrido acético, clivando-o em íons acetato. A formação do anel ocorreu devido ao ataque do oxigênio amídico, carregado negativamente, ao carbocátion situado no carbono azometínico. Os átomos de oxigênio do íon acetato retiram o átomo de hidrogênio do nitrogênio azometínico para formação de ácido acético e do derivado oxadiazolínico como produtos finais da reação. O mecanismo proposto para obtenção dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos está representado na figura 22.

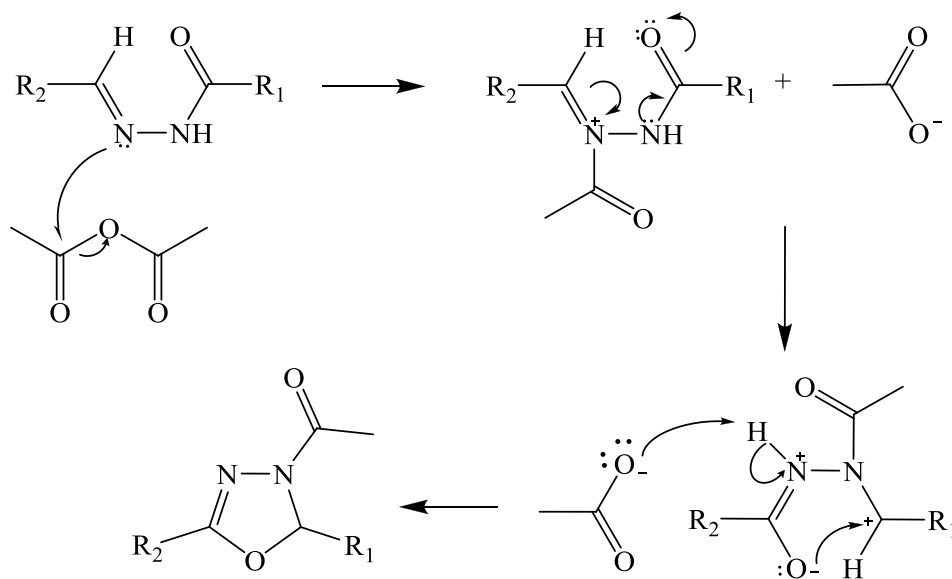


Figura 22: Mecanismo de ciclização oxidativa.

Observa-se que grupos doadores de elétrons na posição 4 do anel aromático são responsáveis por favorecer a carga negativa no nitrogênio benzamídico das 5-nitro-2-tiofilideno benzidrazida substituídas, o que favorece o ataque nucleofílico à carbonila do anidrido acético e, assim, a formação dos produtos de interesse. Em contrapartida, grupos substituintes que retiram elétrons são responsáveis por deslocar os elétrons π do nitrogênio benzamídico das bases de Schiff, o que é responsável por desfavorecer o ataque deste nitrogênio à carbonila do anidrido acético, aumentando, desta forma, o tempo reacional.

Quanto aos substituintes NH₂ e OH, situados no quarto quadrante do diagrama de Craig (1971), não foi possível a obtenção. Tais substituintes apresentam pares de elétrons livres, o que os caracterizam como bons nucleófilos e mais reativos que o nitrogênio imínico da base de Schiff. Para o substituinte OH, observou-se a acetilação do grupo OH e, logo após, a formação do anel 1,3,4-oxadiazolínico, formando-se, assim, outro substituinte, que foi incluído na série de estudo. O grupo OH ataca o carbono carbonílico do anidrido acético, formando, como produto final, um grupamento acetoxi (OCOCH₃) na base de Schiff e ácido acético, de acordo com o mecanismo da figura 23.

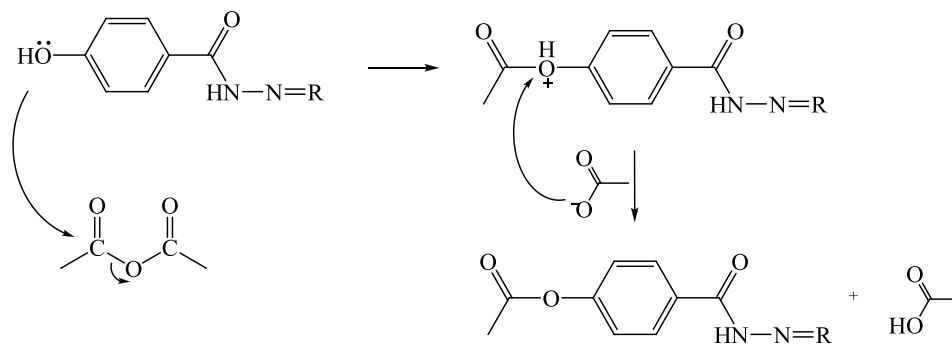


Figura 23: Mecanismo para formação do grupo acetoxi.

Para a obtenção dos substituintes com características de doação de elétrons, é necessário o uso de grupos protetores. A acetilação do grupo hidroxil atua como uma proteção para o mesmo, permitindo que o nitrogênio imínico da base de Schiff atue como nucleófilo. Não obstante, para retirada do grupo protetor são necessárias condições reacionais vigorosas, hidrólise ácida ou básica, que podem clivar a ligação C-O do grupo acetoxi, bem como a ligação C-N do grupo acetil do anel 1,3,4-oxadiazolínico. Tentativas de sintetizar o substituinte NH_2 foram realizadas, contudo, não obteve-se êxito. Para síntese de substituintes aminados, devem-se empregar grupos protetores de eletrófilos que possam ser retirados em condições brandas.

O emprego da atmosfera de nitrogênio para que não houvesse hidrólise do anidrido acético foi crucial para obtenção dos compostos da série em estudo. Observou-se que para reações realizadas em sistema aberto, não foi possível a obtenção dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos, devido à hidrólise do anidrido acético que gera, como produto final, ácido acético, que é responsável pelo insucesso da síntese.

Além dos cuidados com a qualidade do solvente a ser utilizado, foi imprescindível o controle da temperatura. Os compostos foram sintetizados na faixa de temperaturas entre 90 e 120 °C; observou-se que temperaturas acima de 120 °C inviabilizam a síntese, devido à ocorrência de degradação dos reagentes.

Para certificar a total formação dos reagentes em produtos, todas as reações foram acompanhadas através de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase estacionária sílica gel. Eluentes de polaridade crescente foram utilizados, com o intuito de identificar o melhor sistema de separação dos reagentes e produtos, referente à última etapa sintética, como, por exemplo: hexano, tolueno, clorofórmio, éter etílico, acetato de etila, acetona, metanol (Furniss *et al.*, 1989). Deste modo, observou-se que o emprego de solventes isolados não apresentou boa definição na separação dos pontos; por isso, fez-se o uso de diversas soluções de solventes orgânicos como fase móvel, sendo que a solução de

hexano e clorofórmio, na proporção de 4:1, respectivamente, foi a que apresentou melhor resolução. A figura 24 apresenta a cromatografia para obtenção do substituinte NO₂. O ponto à esquerda (T₀) refere-se à aplicação no instante inicial da reação; já o ponto localizado à direita da figura (T_f) reporta-se ao período de 6 horas transcorrido após o início da reação. Da e Dm são as distâncias percorridas pela amostra e fase móvel, respectivamente.

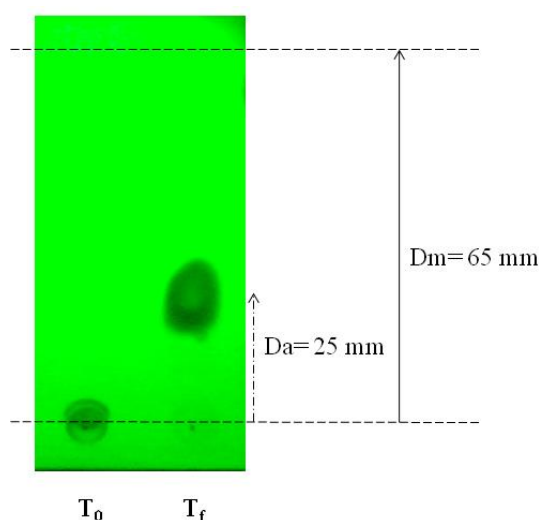


Figura 24: Placa cromatográfica revelada com luz ultravioleta.

O cálculo do fator de retenção (R_f) foi realizado mediante a equação 17. Observa-se que, após o período de 6 horas do início da reação, houve total consumo do reagente, visto que o ponto de aplicação correspondente ao T_f foi totalmente consumido.

$$R_f = Da/Dm \implies R_f = 25/65 = 0,38 \quad \text{Equação 16}$$

Em que:

R_f : fator de retenção

Da: distância percorrida pela amostra

Dm: distância percorrida pela fase móvel

Ao final de cada reação, adicionaram-se de 10 mL de água destilada sob agitação constante, observando-se a precipitação dos compostos de interesse devido à completa

hidrólise do anidrido acético. O rendimento médio obtido na última etapa sintética apresentou valor médio de 56%.

6.2 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

Os derivados 1,3,4-oxadiazolínicos tiveram suas estruturas confirmadas através de análises espectrométrica de RMN ^1H e RMN ^{13}C e a pureza foi avaliada através de análise elementar CHN e faixa de fusão.

6.2.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE HIDROGÊNIO – RMN ^1H

A análise de espectros RMN ^1H permitiu constatar a conformidade dos espectros obtidos com as modificações estruturais propostas para a nifuroxazida. Na figura 25 apresenta-se o espectro de RMN ^1H do substituinte I, em que nota-se a presença de um singlete em aproximadamente 7,56 ppm (H_2), que indica a ciclização do grupamento azometínico da base de Schiff; logo, a formação do anel 1,3,4-oxadiazolínico. Já em 2,27 ppm, há um singlete característico de metila ligada à carbonila, referente ao grupo acetil situado na posição 3 do anel oxadiazolínico. Em 7,85 e 7,60 ppm há um duplete com constante de acoplamento (J) de 8,6 Hz, referente aos prótons do anel fenílico ($\text{H}_{16/18}$ e $\text{H}_{15/19}$). Um duplete em 8,05 ppm (H_8) e outro em 7,45 ppm (H_7), com constante de acoplamento (J) de 4,3 Hz, são referentes ao anel tiofênico.

A estrutura geral dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos apresenta dez prótons, sendo que quatro prótons são pertencentes ao anel fenílico ($\text{H}_{15/19}$ e $\text{H}_{16/18}$), um próton referente ao anel oxadiazolínico (H_2), dois prótons tiofênicos (H_7 e H_8) e, por fim, três prótons metílicos pertencentes ao grupo acetil (H_{22}) localizado na posição 3 do anel oxadiazolínico. Os espectros de RMN ^1H de todos os compostos obtidos estão em conformidade com as estruturas propostas e apresentam-se ampliados no anexo A.

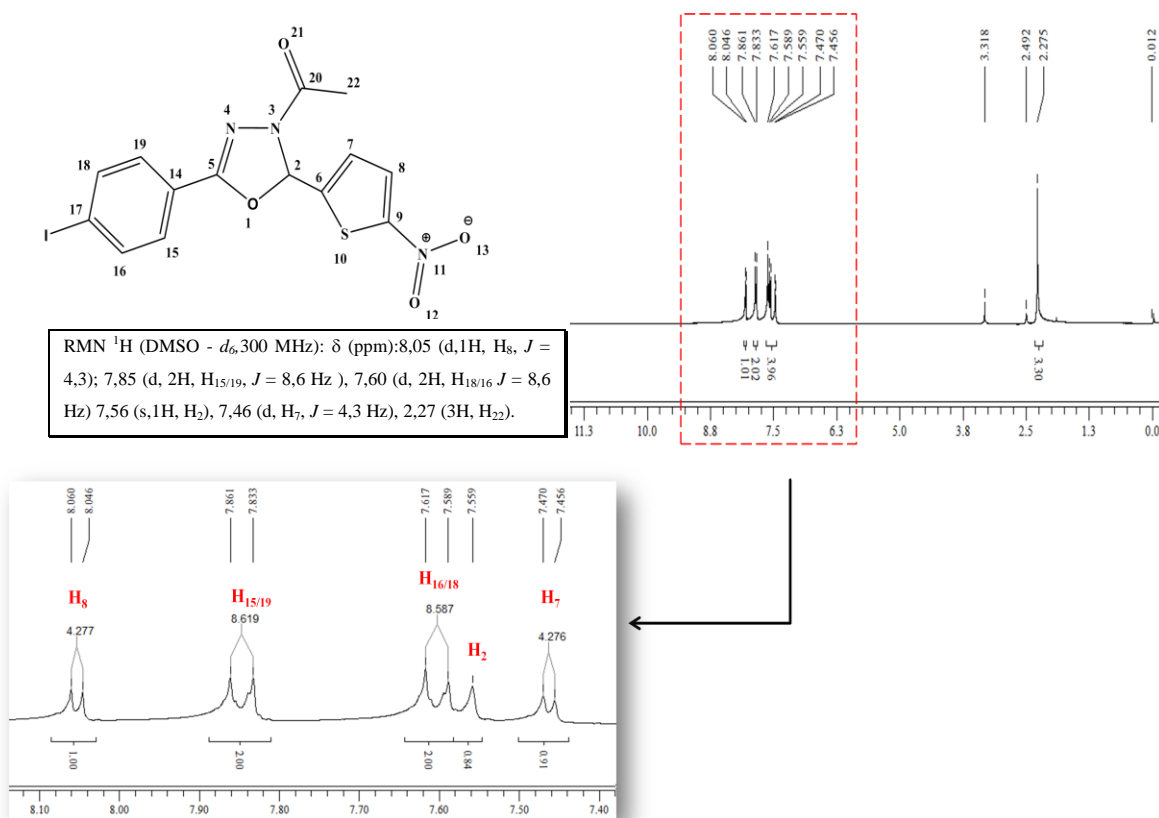


Figura 25: Espectro de RMN ^1H indicando os principais sinais para a identificação dos compostos da série 2-[5-nitro-ti-feno-2-il]-3-acetil-5-[4-fen-il-metoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

6.2.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DE CARBONO – RMN ^{13}C

Os derivados oxadiazolínicos possuem quatorze carbonos pertencente à estrutura comum, sendo que seis carbonos são aromáticos fenílicos (C_{14} , C_{15} , C_{16} , C_{17} , C_{18} , C_{19}), quatro tiofênicos (C_6 , C_7 , C_8 e C_9), um carbonílico (C_{20}), um alquílico (C_{22}) e dois carbonos pertencentes ao anel oxadiazolínico, sendo um carbono saturado (C_2) e um insaturado (C_5).

Na figura 26 apresenta-se o espectro de RMN ^{13}C do substituinte I, que tem sinais típicos de formação dos derivados oxadiazolínicos. No espectro do substituinte I, evidenciam-se sinais de carbono carbonílico em 167,2 ppm (C_{20}), de radicais alquílicos (metila do grupo acetil - C_{22}), e em 86,5 ppm, sinal referente ao carbono assimétrico do anel oxadiazolínico (C_2). Os espectros de RMN ^{13}C de todos os compostos obtidos estão em conformidade com as modificações propostas na molécula de nifuroxazida e apresentam-se ampliados no anexo B.

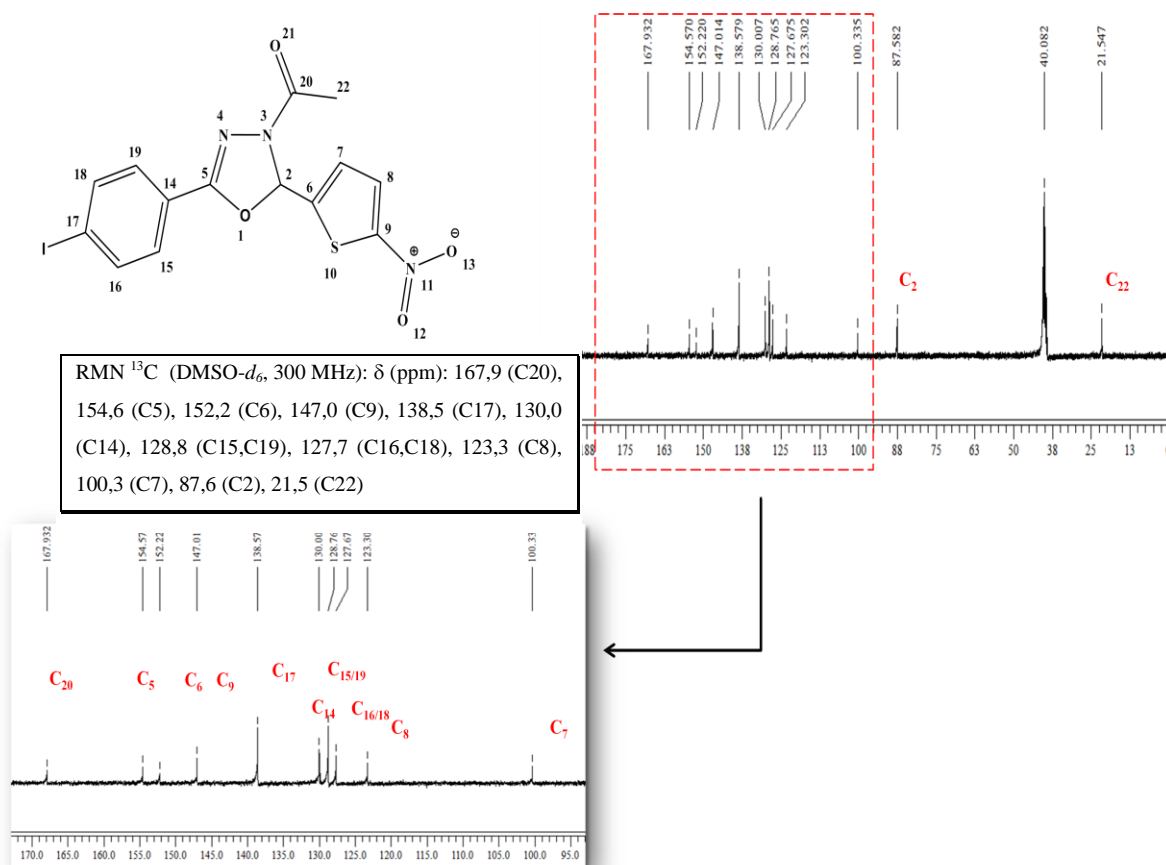


Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C indicando os principais sinais para a identificação da 2-[5-nitro-tiopheno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-iodo]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

6.2.3 ANÁLISE ELEMENTAR – CHN E FAIXA DE FUSÃO

Como critério de pureza foram utilizadas a faixa de fusão e a análise elementar, demonstrando alto grau de pureza dos compostos obtidos. A faixa de fusão para todos os compostos obtidos apresentou intervalo menor que 1 °C. Na análise elementar, o valor do desvio (Δ) foi obtido através do cálculo teórico do percentual de CHN, subtraindo-se pelo valor obtido experimentalmente, em módulo. Ressalta-se que para o substituinte CN o alto valor de Δ obtido explica-se pelo fato deste composto apresentar-se hidratado. A tabela 26 apresenta os valores obtidos experimentalmente da análise elementar CHN para o substituinte ciano, comparando os valores Δ obtidos em duas condições distintas.

Tabela 26: Comparação dos valores de desvio (Δ) obtidos para o substituinte ciano

R	Fórmula Molecular	Massa Molecular	%C			%H			%N		
			Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ	Exp.	Calc.	Δ
CN	C ₁₅ H ₁₀ N ₄ O ₄ S	342,04	49,76	52,63	2,87	3,78	2,94	0,84	15,83	16,37	0,54
CN	C ₁₅ H ₁₀ N ₄ O ₄ S.H ₂ O	360,34	49,76	50,00	0,24	3,78	3,36	0,42	15,83	15,55	0,28

Na primeira condição, o valor de delta foi calculado considerando-se apenas as porcentagens dos elementos C, H e N na massa molar do substituinte, que é 342,04 (C₁₅H₁₀N₄O₄S), o que resultou em alto valor de Δ para os três elementos analisados. Por outro lado, quando se adicionou uma molécula de água na fórmula molecular do substituinte (C₁₅H₁₀N₄O₄S.H₂O) e novamente calculou-se o percentual dos elementos C, H e N referente à massa molar hidratada, os valores de Δ obtidos para os três elementos foram bem próximo aos obtidos experimentalmente, o que indica que os compostos apresentavam certo teor de hidratação. Assim, para que este substituinte se tornasse viável para as análises *in vitro*, este composto permaneceu por maior tempo em dessecador em presença de pentóxido de fósforo e sílica.

6.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Para a determinação do valor de IC₅₀ de todos os compostos avaliados, empregou-se a correlação do logaritmo das concentrações avaliadas com o percentual de inibição de crescimento. Todos os compostos foram avaliados em 6 concentrações diferentes, entretanto, para os compostos I, Br, CN, OC₂H₅, OC₄H₉, C₂H₅, NO₂, OCOCH₃, OCH₃, OC₃H₇, CF₃ e H foram construídas regressões com cinco pontos, visando obter valores de r² mais próximos de 1 e reduzir o valores de desvio padrão e de IC₅₀.

Tendo em vista a atividade pouco pronunciada do substituinte OC₂H₅, o mesmo foi avaliado em intervalo de concentração de 3,75 a 40 μ M. Não foi possível a determinação de concentrações maiores que 40 μ M, devido à solubilidade reduzida do mesmo no meio de cultivo. Assim, para este caso, a determinação dos valores de IC₅₀ foi empregada fazendo o uso do modelo exponencial, pois o intervalo de pontos obtidos não permitiu a análise através do modelo dose-resposta.

Através da análise do gráfico da figura 27, observa-se que todos os compostos avaliados são mais ativos que o benzimidazol, fármaco padrão utilizado atualmente na terapêutica, sendo que somente o OC₂H₅ apresentou-se menos ativo, com valor de IC₅₀ de

26,6 μM . Os substituintes que se apresentaram mais ativos foram OCOCH_3 e CN, com valores de IC_{50} iguais a 7,91 μM e 8,19 μM , respectivamente.

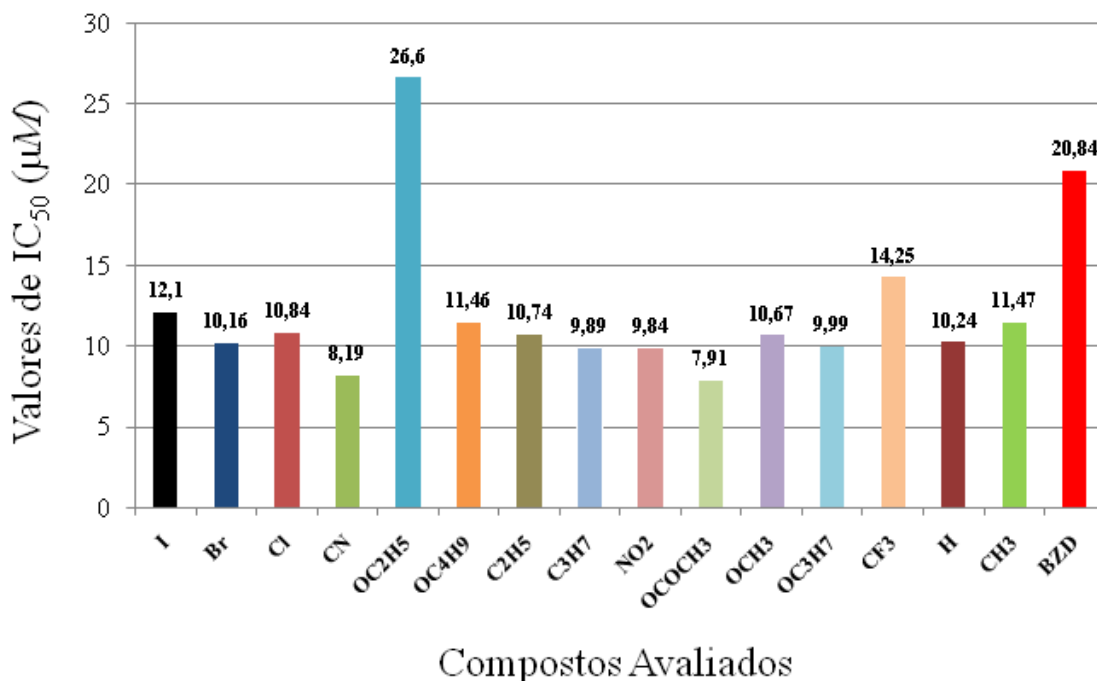


Figura 27: Gráfico que apresenta a comparação dos valores de IC_{50} de todos os substituintes da série com o benznidazol (BZD).

6.4 ESTUDO QUANTITATIVO DE RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE EM DUAS DIMENSÕES – QSAR-2D

6.4.1 DADOS BIOLÓGICOS PARA ESTUDOS DE QSAR

Para a construção de um modelo de QSAR válido, é necessário o planejamento de análogos que apresentem grande variabilidade da atividade biológica, ou seja, compostos com atividade baixa, mediana e alta. Para construção de modelos de QSAR com melhor capacidade preditiva, é necessário que o conjunto de dados de atividade biológica apresente uma faixa de variação de 2 unidades logarítmicas (Selassie, 1998).

Para os dados obtidos neste trabalho, através da análise da distribuição dos compostos em função dos valores de potência, figura 28, nota-se que todos os compostos estão contidos em um intervalo inferior a 2 unidades logarítmicas, o que indica que todos derivados oxadiazolínicos avaliados apresentaram atividade biológica equivalentes.

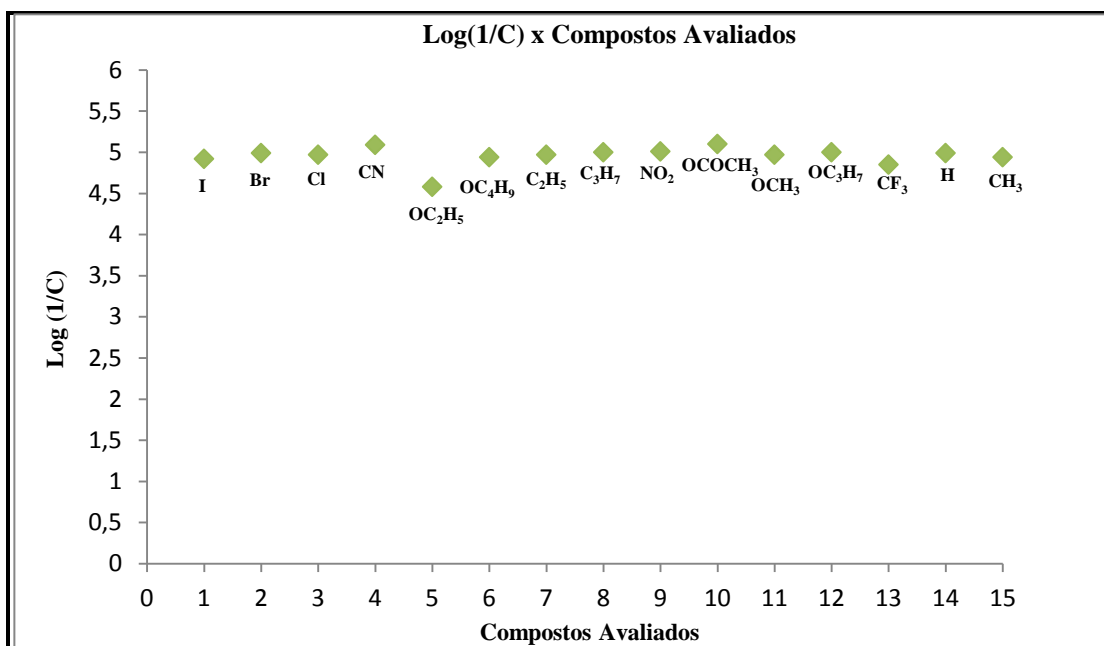


Figura 28: Gráfico de dispersão da atividade anti-*T. cruzi* correlacionando potência *versus* compostos avaliados.

Não obstante, a busca por parâmetros físico-químicos que se correlacionem com a atividade biológica é de extrema importância para o desenvolvimento de análogos mais promissores. Deste modo, a análise do comportamento da atividade biológica de uma dada série, em função de parâmetros físico-químicos, é de grande valia para posteriores estudos de QSAR, mesmo que esta série não apresente variabilidade de potência adequada para estudos deste gênero.

6.4.2 ANÁLISE DE HANSCH

Para análise de QSAR-2D ou análise de Hansch foram avaliados 15 compostos com valores de atividade biológica expressos na forma de IC_{50} , utilizando a molaridade (M) como unidade de concentração. Todos os valores de IC_{50} foram convertidos em potência, $\text{Log}(1/M)$. A variável dependente (atividade biológica) foi correlacionada com um e dois descritores das propriedades físico-químicas (variável independente), que estão relacionados com hidrofobicidade, propriedades eletrônicas e estereoquímicas. Os descritores, \mathfrak{R} e π , expressam os efeitos eletrônicos e de ressonância, respectivamente, e foram os que apresentaram a melhor correlação com a atividade anti-*T. cruzi*.

A influência das propriedades físico-químicas, representadas por estes descritores, no mecanismo de ação dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos, explica-se pelo fato de que,

para um fármaco exercer seus efeitos farmacológicos, é necessário que primeiro ocorra sua absorção através da membrana plasmática e, para isso, deve este apresentar hidrofobicidade adequada. Por outro lado, sabe-se que o mecanismo de ação de nitrocompostos, em condições aeróbicas, é decorrente da produção de radical nitro ânion, que reage com o oxigênio, formando ânions peróxidos, que são letais às células do parasita. O efeito de ressonância poderia influenciar na estabilização do radical nitro ânion formado, o que poderia tornar os radicais livres produzidos mais ou menos reativos, sendo, portanto, o efeito de ressonância aliado com efeito hidrofóbico, propriedades físico-químicas responsáveis por modular a atividade anti-*T. cruzi* da série dos compostos avaliados neste trabalho.

Para o conjunto de dados, foram avaliados os modelos linear, parabólico e bilinear, sendo que o modelo que apresentou melhor adequação foi o modelo parabólico. A seguir, apresenta-se a equação 15a e os parâmetros estatísticos para o conjunto dos 15 compostos.

$$\text{Log}(1/C) = +0,124 (\pm 0,128)\pi^2 - 0,136 (\pm 0,143)\pi + 0,158 (\pm 0,203)\mathfrak{R} + 4,95343 (\pm 0,081)$$

$$(n = 015; r = 0,667; s = 0,101; F = 2,942) \pi_{\text{ótimo}} = -0,549$$

Equação 15a

Os parâmetros estatísticos ruins, obtidos da equação 15a, devem-se ao fato da presença de um ponto anômalo (*outlier*), ou seja, um ponto fora da tendência dos compostos da série. Para que uma equação apresente validade estatística, todos compostos devem estar contidos no intervalo de dois desvios padrão (Kubyini, 1993). O gráfico da figura 29, que correlaciona a atividade prevista *versus* a observada apresenta, como ponto anômalo da série, o **etoxi-derivado**. Através da análise de resíduo, gráficos das figuras 30 e 31, que é a diferença entre o valor da atividade biológica observada pela atividade prevista pelo modelo, pôde-se observar que o **etoxi-derivado** apresenta valor de resíduo maior que dois desvios padrão.

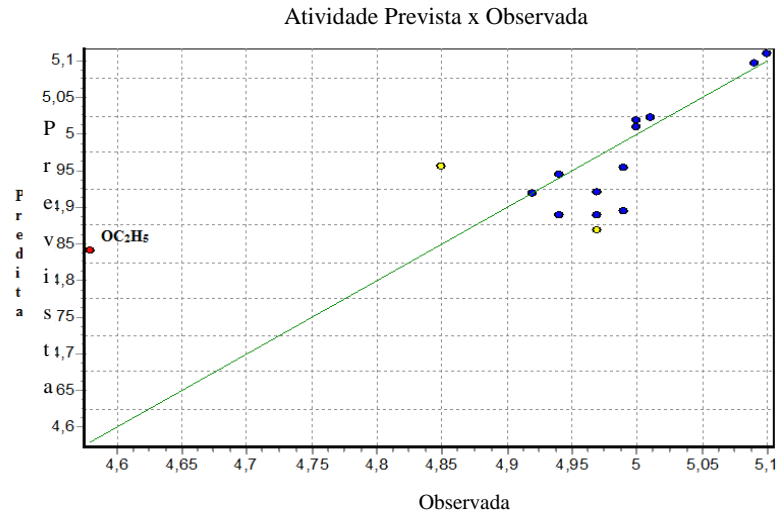


Figura 29: Gráfico de relação da atividade prevista *versus* atividade observada.

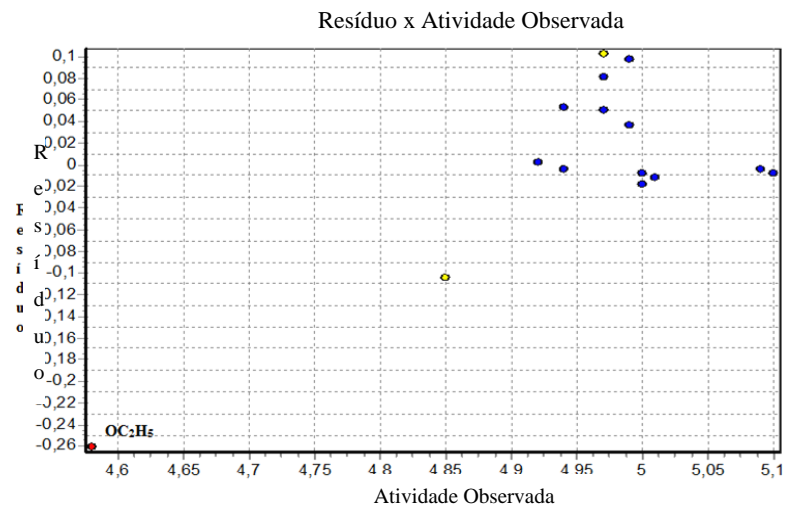


Figura 30: Gráfico de resíduo *versus* atividade observada.

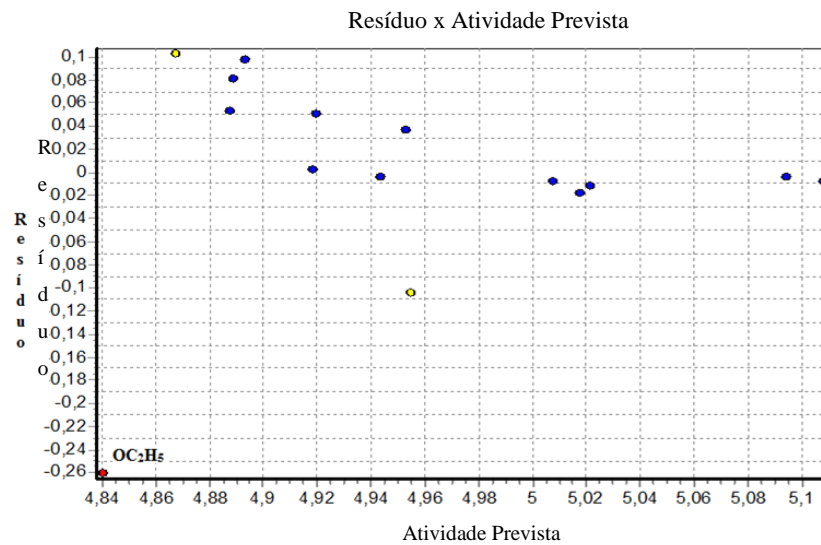


Figura 31: Gráfico de resíduo *versus* atividade prevista.

Subtraindo-se da série o **etoxi-derivado**, obteve-se o modelo referente à equação 15b, que é apresentada a seguir:

$$\text{Log}(1/C) = + 0,067 (\pm 0,057) \pi^2 - 0,110 (\pm 0,061) \pi + 0,034 (\pm 0,094) \mathfrak{R} + 4,99135 (\pm 0,036)$$

$$(n=014; r=0,809; s=0,043; F=6,324) \pi_{\text{ótimo}} = - 0,817$$

Equação 15b

Através da eliminação do etoxi derivado obteve-se a melhora do modelo obtido; contudo, este modelo ainda apresenta baixo valor de r. Preconiza-se que o valor de r deve ser maior que 0,9 para ensaios *in vitro* e maior que 0,8 para ensaios *in vivo* (Kubyini, 1993). Os gráficos das figuras 31, 32 e 33 referem-se ao modelo da equação 15b.

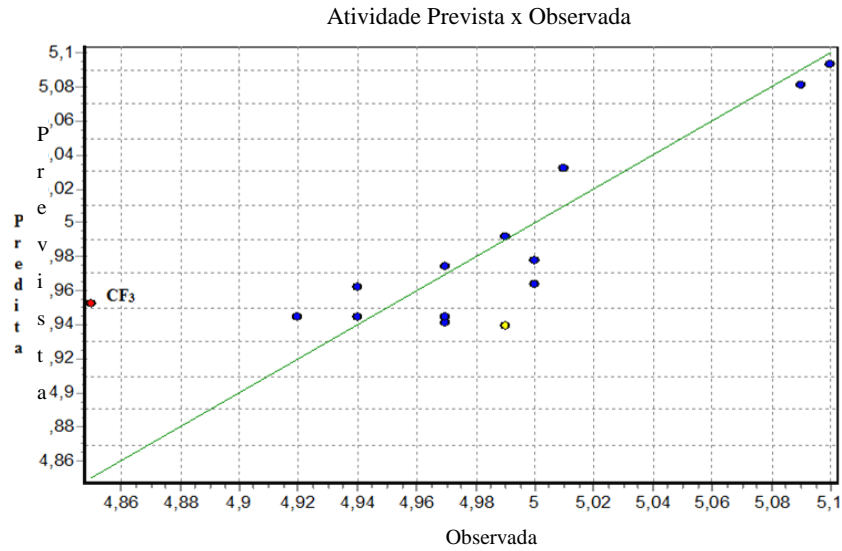


Figura 32: Gráfico de relação da atividade prevista *versus* atividade observada referente à equação 15b.

A análise da figura 32, bem como das figuras 33 e 34, permite constatar que **triflúormetil-derivado** também teve comportamento anômalo quando comparado aos demais compostos da série, pois apresentou valor de resíduo maior que 0,086 (2s), o que o caracterizou como um *outlier*.

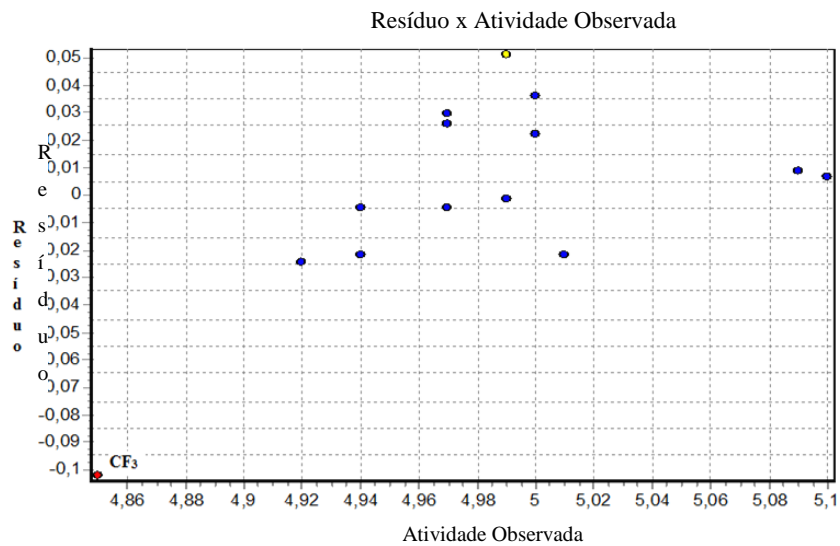


Figura 33: Gráfico de resíduo *versus* atividade observada referente à equação 15b.

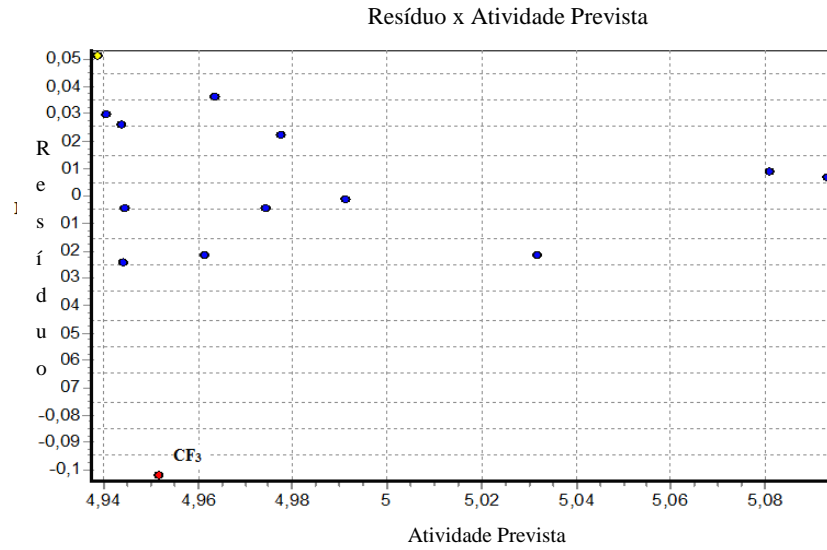


Figura 34: Gráfico de resíduo *versus* atividade prevista referente à equação 15b.

A retirada do triflúormetil-derivado do modelo obtido referente à equação 15b gerou a equação 15c, que é apresentada a seguir:

$$\text{Log}(1/C) = + 0,056 (\pm 0,033) \pi^2 - 0,089 (\pm 0,036) \pi + 0,069 (\pm 0,056) \mathfrak{R} + 5,001 (\pm 0,021)$$

$$(n = 013; r = 0,921; s = 0,024; F = 16,888) \pi_{\text{ótimo}} = - 0,798$$

Equação 15c

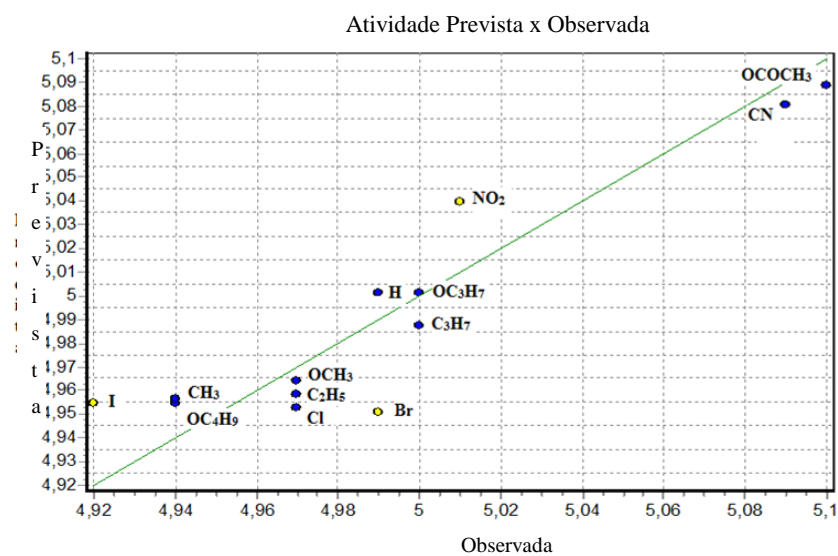


Figura 35: Gráfico de relação da atividade prevista *versus* atividade observada referente à equação 15c.

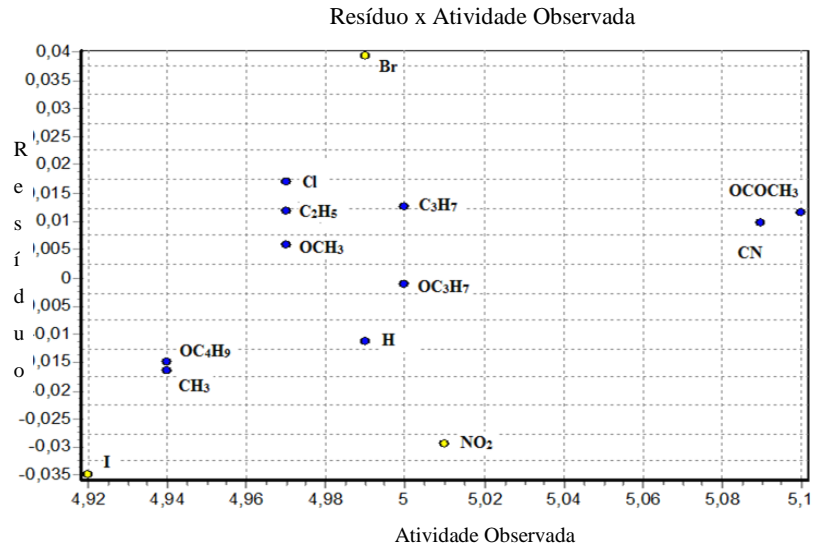


Figura 36: Gráfico de resíduo *versus* atividade observada referente à equação 15c.

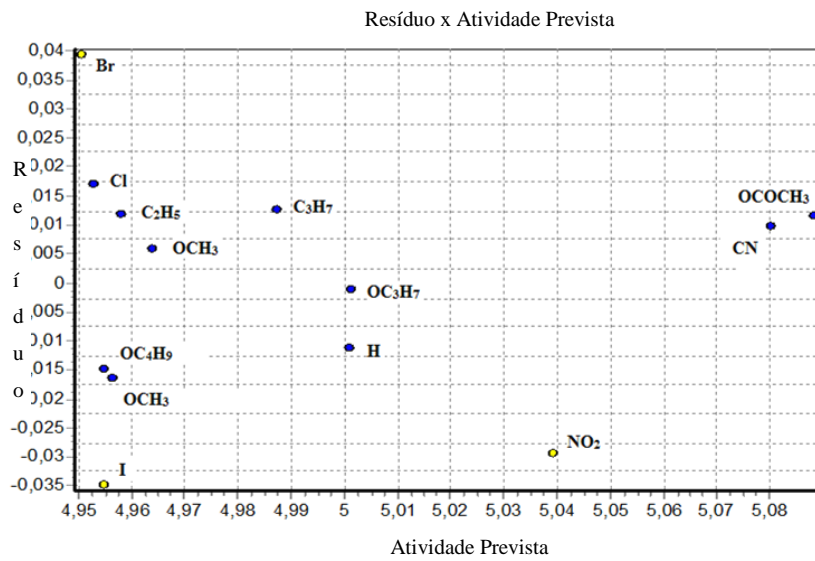


Figura 37: Gráfico de resíduo *versus* atividade prevista referente à equação 15c.

A figura 38 demonstra de maneira resumida as etapas realizadas para obtenção do modelo matemático que apresentou maior significância estatística.

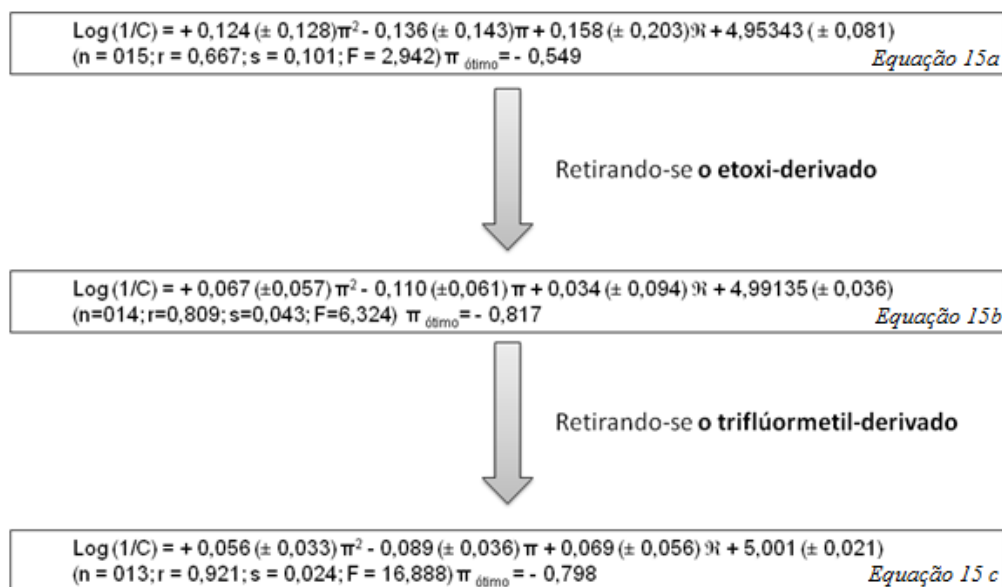


Figura 38: Esquema apresentando as etapas para a obtenção do modelo parabólico que correlaciona a atividade anti-*T. cruzi* com os descritores físico-químicos, π e \mathfrak{R} , para a série 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas.

Para a série dos derivados 1,3,4-oxadiazolínicos, os derivados retirados da análise de QSAR-2D foram os que apresentaram os menores valores de atividade biológica. O uso de ferramentas como QSAR-2D não permite ampla compreensão do comportamento dos derivados retirados da análise, já que a metodologia utilizada não vislumbra as interações em aspectos tridimensionais dos compostos da série com possíveis receptores ou enzimas, que são cruciais para o metabolismo do parasita. Ressalta-se também, que para estudos de QSAR é ideal que haja variação de no mínimo duas unidades logarítmicas entre os valores de atividade biológica, condição que mesmo com o planejamento da série, não foi possível satisfazer.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho consta da síntese e da identificação de 22 compostos, incluindo intermediários e compostos finais, referentes à série 2-[5-nitro-tiofeno-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-R-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas, que apresentou rendimentos sintéticos moderados. Quanto às estruturas dos compostos sintetizados, estas foram confirmadas através de análise espectrométrica de RMN ^1H e RMN ^{13}C e o teor de pureza foi avaliado mediante análise elementar CHN e faixa de fusão.

Os compostos mais ativos da série foram os derivados 4-OCOCH₃ (IC₅₀ = 7,91 μM) e o 4-CN (IC₅₀ = 8,19 μM) e os menos ativos, os derivados 4-OC₂H₅ (IC₅₀ = 26,60 μM) e o 4-CF₃ (IC₅₀ = 14,25 μM). Ressalta-se que de todos avaliados, somente o derivado 4-OC₂H₅ não foi mais ativo que o benznidazol (IC₅₀ = 20,84 μM), fármaco utilizado como padrão nos ensaios biológicos.

Frente aos estudos de QSAR-2D, entre os modelos linear, parabólico e bilinear, o que melhor se adequou ao comportamento da atividade anti-*T. cruzi* da série de derivados 1,3,4-oxadiazolínicos foi o modelo parabólico. A eliminação dos compostos menos ativos (*outlier*) da série gerou a equação 15c, que apresentou melhor ajuste dos parâmetros estatísticos.

Foram identificadas, como propriedades físico-químicas responsáveis por modular à atividade anti-*T. cruzi*, a hidrofobicidade e o efeito eletrônico, expressos pelos descritores π e \mathfrak{R} , respectivamente.

Para maior compreensão do comportamento da atividade anti-*T. cruzi* dos derivados 1,3,4-oxadiazolínico deve-se ampliar a série com o emprego de grupos protetores, permitindo a síntese dos substituintes situados no terceiro quadrante do diagrama de Craig (1971). A obtenção de novos derivados permitirá a identificação de compostos com atividade anti-*T. cruzi* baixa, moderada e alta, possibilitando, desta forma, os estudos de QSAR-3D.

8 REFERÊNCIAS

AGUIRRE, BOIANI, M., CERECETTO, H., GERPE, A., GONZALEZ, M., SAINZ, Y. F. DENICOLA, A., OCARIZ, C. O., NOGAL, J. J., MONTERO, J., ESCARIO, J. A. Novel antiprotozoal products: Imidazole and benzimidazole N-oxide derivatives and related compounds. **Arch. Pharm.**, v. 337, p. 259–270, 2004.

AGUIRRE, G., BOIANI, L., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZALEZ, M., PORCAL, W., DENICOLA, A., MOLLER, M., THOMSON, L., TORTORA, V. [1,2-c] 1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Structure-Activity relationships Part III: substituents-clustering methodology in the search for new active compounds. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, p. 6234 – 6335, 2005.

AGUIRRE, G., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZALEZ, M., PORCAL, W., SEOANE, G., ORTEGA, M. A. ALDANA, I., MONGE, A., DENICOLA, A. Benzol [1,2-c] 1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Structure-Activity relationships Part II. **Arch. Pharm.**, v. 335, p. 2- 15, 2002.

ALMEIDA, L. V. Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas frente à cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*. São Paulo, 2009. p. 148. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

AMARAL, A. T. Frequência de estiramento do grupo carbonila. **Ann. Assoc. Bras. Quim.**, Rio de Janeiro, v. 30, p. 45-51, 1979.

ANAND, N. REMERS, W. A. Synthetic Antibacterial Agents. In.: BURGER, A. WOLFF, M. Burger's Medicinal Chemistry. 6 ed. New York: Willey-Interscience. 1998. v. 5, p. 537 – 606.

ANCIZU, S., MORENO, E., TORRES, E., BURGUETE, A., PÉREZ-SILANES, S., BENÍTEZ, D., VILLAR, R., SOLANO, B., MARÍN, A., ALDANA, I., CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M., MONGE, A. Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1,4-di-N-oxidequinoxalina-2-yl) amide derivatives as hits for the development of neglected disease drugs. **Molecules**, Pamplona, v. 14, n. 6, p. 2256-2272, 2009.

ANDRADE S. G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, n. 1, p. 39-46, 1985.

ANDRADE S. G., MAGALHÃES J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 27-35, 1997.

ANDRADE SG. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano: Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio. **Rev. Pat. Trop.**, v. 3, p. 65-121, 1974.

ANDRADE, A. L. S. S., ZICKER, F., OLIVEIRA, R. M., SILVA, S. A., LUQUETTI, A., TRAVASSOS, L. R., ALMEIDA, I. C., ANDRADE, S. S., ANDRADE, J. G.,

MARTINELLI, C. M. T. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**, v. 348, p. 1407-1413, 1996.

ARAN, J. V., OCHOA, C., BOIANI, L., BUCCINO, P., CERECETTO, H., GERPE, A., GONZALES, M., MONTERO, D., NOGAL, J. J., GOMEZ-BARRIO, A., AZQUETA, A., CERAIN, A. L., PIRO, O. E., CASTELLANO, E. E. Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, p. 3197 - 3207, 2005.

BAHIA-OLIVEIRA LM, GOMES JA, CANÇADO JR, FERRARI TC, LEMOS EM, LUZ ZM, MOREIRA MC, GAZZINELLI G, CORREA-OLIVEIRA R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 634-638, 2000.

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

BROWNDER, K. Electronic Effects in Drugs. In: Hansch, C.; Sammes, G. P.; Taylor, J. B. **Comprehensive medicinal chemistry**: the rational design, mechanistic study and therapeutic application of chemical compounds, v. 4. Oxford: Pergamon Press, 1990.

CANÇADO J. R. Long term evaluation of etiologic treatment of Chagas disease with benznidazole. **Rev. Inst. Med. Trop.**, Sao Paulo, v. 44, p. 29-37, 2002.

CANDENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 110, p. 58-79, 1989.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 12 fevereiro 2011.

CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZALEZ, 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.**, v. 42, p. 1941 – 1950, 1999.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sob a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159–218, 1909.

CHAMBERLAIN, R. E. Chemotherapeutic properties of prominent nitrofurans. **J. Antimicrob. Chemother.**, New York, v. 2, p. 325-336, 1976.

CLAYDEN, J.; WARREN, S.; GREEVES, S. **Organic Chemistry**. 1 ed. Oxford: University, 2000, 1392 p.

COURA, J. R., VIÑAS, P., A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature Outlook**, v. 465, p. S 6-7, 2010.

CROFT, S. L., BARRETT, M. P., URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends Parasitol.**, v. 21, n. 11, p. 508-512, 2005.

CRUM-BROWN, A., FRASER, T. R. On the connection between chemical constitution and physiological action. **Soc. Edinburgh**, v. 25, 151-203, 1868.

DAYAN, J., DEGUIGAND, C., TRUZMAN, C. Study of mutagenic activity of 6 hepatotoxic pharmaceutical drugs in the *Salmonella thiphimurium* microsome test and Na⁺/K⁺ ATPasesystem in cultered mammalian cells. **Mutat. Res.**, Amsterdan, v. 157, n. 1, p. 1 – 12, 1985.

DAYAN, J., DEGUIGAND, C., TRUZMAN, C., CHEVRON, M. Application of the SOS chormotest to 10 pharmaceutical agents. **Mutat. Res.**, Amsterdan, v. 187, n. 2, p. 55 – 66, 1987.

DEBENATH, J., HANSCH, C., KIM, K. H., MARTIN, Y. C. Mechanistic interpretation of genotoxicity of nitrofuran (antibacterial agents) using quantitative structure-activity relationships and comparative molecular field analysis. **J. Med. Chem.**, Columbus, v. 36, p. 1007 – 1010, 1993.

DEVERA, R., ILLARRAMENDI, X., MONTOYA-ARAUJO, R., PIRMEZ, C., FERNANDES, OCTAVIO, COURA, J. R. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isolados de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 4, p. 323-330, 2002.

DIAS J. C. P. The treatment of Chagas disease (South American Trypanosomiasis). **Ann. Int. Med.**, v. 144, p. 772-774, 2006.

DIAS, R. L. D., CORRÊA, A. G. Aplicação da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. **Quim. Nova**, v. 24, n. 2, p. 236 - 242, 2001.

DICKSON, M., GAGNON, J. P. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 5, p. 417-429, 2004.

DIMASI, J. A., HANSEN, R. W.; GRABOWSKY, H. G. The price of innovation: new estimates of drugs development cost. **J. Health Econom.**, v. 22, p. 151-185, 2003.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chem. Biol. Interact.**, n. 1, v. 73, p. 1 – 27, 1990.

DOCAMPO, R., MORENO, S. N. J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutics agents and phagocytic cells on *T. cruzi*. **Rev. Infect. Dis.**, v.6, p. 223 – 238, 1984.

DODD, M. C., STILLMAN, W. B. The in vivo bacteriostatic action of some simple furan derivatives. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, Bethesda, n. 1, v. 82, , p. 42-43, 1985.

Edward, D. I. DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, n. 19, p. 3299-3304 1986.

EDWARDS, D. I. IN: SAMMES, P. G.; TAYLOR, J. B. **Comprehensive Medicinal Chemistry**: the reational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds. Oxford: Pergamon Press, v. 2, 1990. 725 p.

FOYE, W. O., LEMKE, T. L., WILLIAMS, D. A. **Principles of medicinal chemistry**. 4 ed., Baltimore: Willians & Wilkins, 1995. 995 p.

FRIES, D. S., FAIRLAMB, A. H. Antiprotozoal agents. In: BURGER, A. WOLFF, M. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 6 ed. Virginia: Willey-Interscience. 1998. v. 5, p 1033 - 1088.

FRIES, D. S., FAIRLAME, A. H. Antiprotozoal Agents. In: Abraham, D. J., **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**, 6 ed. Virginia: Wiley Intersciences, v. 5, 2003, p. 1034-1076.

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

FURNISS, B. S., HANNAFORD, A. J., SMITH, P. W. G., TATCHELL, A. R. **Textbook of practical organic chemistry**. 5 ed. New York: Longman Scientific & Technical. 1989, 1540p.

GASCON J., BERN C., PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Trop.**, v. 115, p. 7-22, 2009.

GAUDIO, A. C. Modelos Clássicos de estudo quantitativo das relações entre estrutura-química e atividade biológica. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 19, n. 03, p. 278-289, 1996.

GERPE, A., BOIANI, L., HERNÁNDEZ, P., SORTINO, M., ZACCHINO, S., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H. Naftifine-analogues as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 2154 – 2164, 2010.

GILLES, H. M. **Protozoal Diseases**. London: Arnold, 1999, 707 p.

GUIDO, R. V. C. Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Tripanosoma cruzi*: biologia, estrutura e química medicinal. São Carlos, 2008. p. 229. (Tese de Doutorado - Instituto de Física de São Carlos - USP).

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 11 ed. Missipi: Elsevier, 2006. 1152 p.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. London: Oxford, 1998. 939 p.

HANSCH, C. A quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. **Acc. Chem. Res.**, Columbus, v. 2, n. 08, p. 232-239, 1969.

HANSCH, C., FUJITA, T. ρ - σ - π analysis: a method for the correlation of biological activity and chemical structure. **J. Am. Chem. Soc.**, Columbus, v. 86, n. 08, p. 1616-1626, 1964.

HANSCH, C., LEO, A. **Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and biology.** Washington: American Chemical Society, 1995a.

HANSCH, C., LEO, A. J. **Substituent constant for correlation analysis in chemistry and biology.** New York: John Wiley, 1979.

HANSCH, C., LEO, A., HOEKMAN, D. **Exploring QSAR: Hydrofobic, Eletronic and Steric Constants.** Washington: American Chemical Society, 1995b.

HANSCH, C., SELASSIE, C. Quantitative structure-activity relationship – a historical perspective and the future. In. TAYLOR , J. B. , TRIGGLE , D. J. **Comprehensive Medicinal Chemistry: Computer-Assisted Drug Design**, vol. 4. Oxford: Pergamon Press, 1990.

HANSCH, C.; LEO, A.; TAFT, R. W. A survey of Hammett substituent constant and resonance and field parameters. **Chem. Rev.**, Columbus, v. 91, n. 1, p. 165-195, 1991.

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

JORGE, S. D. Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR de derivados benzofuroxânicos com atividade frente *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi*. São Paulo, 2010. p. 250. (Tese de Doutorado - Qualificação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica texto e atlas.** 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 524 p.

KABA, R. A., MALONEY, T. P., KRUEGER, J. P., KRATZ, R., TABIN, J., FLANERY, F. E. T. Intellectual property drug discovery and biotechnology. In: BURGER, A. WOLFF, M. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery.** 6 ed. New York: Willey-Interscience. 1998. v. 2, p. 703 – 782.

KALISZAN, R. High performance liquid chromatographic method and procedures determination. **Quant. Struct. Acta Relat.**, Weinhein, v. 9, n. 2, p. 83-87, 1990.

KAPPUS, H. Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling. **Biochem. Pharmacol.**, v. 35, n. 1, p. 1-6, 1986.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, 2003. 1054 p.

KOROLKOVAS, A., FRANÇA, F. F. C. **Dicionário Terapêutico Guanabara.** 12 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2005.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química Farmacêutica.** Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. 783 p.

KUBINYI, H. Lipophilicity and drug activity. **Progr. Drug Res.**, Basel, v. 23, n. 08, p. 97-198, 1979.

KUBINYI, H. **QSAR**: Hansch analysis and related approaches. New York: VCH, 1993, 240 p.

KUBINYI, H. Strategies and recent technologies in drug discovery. **Pharmazie**, Eschborn, v. 50, n. 7, p. 647-662, 1995.

KUBINYI, H., Quantitative structure-activity relationships: the bilinear, a new model for nonlinear dependence of biological activity on hydrophobic character. **J. Med. Chem.**, Columbus, v.20, p. 625-629, 1977.

LEO, A., HANSCH, C., ELKINS, D. Partition coefficients and their uses. **Chem. Rev.**, v. 71, p. 525 - 616, 1971.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuições brasileira. **Quim. Nova**, Rio de Janeiro, v. 6, p. 1456-1468, 2007.

LOMBARDINO, J.G., LOWE, J.A. The role of medicinal chemist in drug discovery then and now. **Nat. Rev. Discov.**, v. 3, p. 853-862, 2004.

MASUNARI, A. Planejamento, desenvolvimento e estudo de QSAR-2D e QSAR-3D de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente. São Paulo, 2005. p. 231. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).

MAYA, J. D., CASSELS, B. K., ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P., FERREIRA, J., FAÚNDEZ, M., GALANTI, N., FERREIRA, A., MORELLO, A., **Comp. Biochem. Physiol A Mol Integr. Physiol.**, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.

MERLINO, A., BENITEZ, D., CHAVEZ, S., DA CUNHA, J., HERNANDEZ, P., TINOCO, L.W., CAMPILLO, N.E., PAEZ, J.A., CERECETTO, H., GONZALEZ, M. Development of second generation amidinohydrazones, thio- and semicarbazones as *Trypanosoma cruzi*-inhibitors bearing benzofuroxan and benzimidazole 1,3-dioxide core scaffolds. **Med. Chem. Commun.**, v. 1, p. 216 - 228, 2010.

MICHAEL, W., MEHLIN, C., TRIGGLE, D. J. Receptor targets in drug discovery and development. In: BURGER, A. WOLFF, M. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 6 ed. New York: Willey-Interscience. 1998. v. 2, p. 319 - 356.

MILES M. A., TOYE P. J., OSWALD S. C., GODFREY D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, p. 217-225, 1977.

MIURA, K.; REQUENDORF, H.K.. The nitrofurans. **Progr. Med. Chem.** London, v. 5, p. 320-381, 1967.

MOREL C, CHIARI E, CAMARGO EP, MATTEI DM, ROMANHA AJ, SIMPSON L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Nat. Ac. Sci. USA**, v. 77, p. 6810-6814, 1980.

MORRISON, R. T., BOYD, R. N. **Química orgânica**. 5 ed. New York. Addison Wesley Iberoamericana, 1997, 1639 p.

NETO, P. J. R. Delineamento de Alternativas Terapêuticas para o Tratamento da Doença de Chagas. **Rev. Pat. Trop.**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

NEVES, D. P.; MELLO, A. L.; LUNARDI, P. M.; VICTOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 498 p.

OLIVER, P. L. Correlation between metabolic reduction rates and electron affinity of nitroheterocycles. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 39, p. 1412 – 1415, 1979.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 4 ed. Oxford: University Press Inc., 2009. 752 p.

PAUL, H. E., PAUL, M. F. The nitrofurans: Chemotherapeutic properties. In: Experimental Chemotherapy. New York: Academic Press, v. 2, 1964. p 307-370.

PEREIRA, K. S., SCHIMIDT, F. L.; GUARALDO, A. M. A.; FRANCO, R. M. B.; DIAS, V. L.; PASSOS, L. A. C. Chagas disease as a Foodborne Illness. **J. Food Prot.**, v. 72, n. 2, p. 441-446, 2009.

PRATA A. Significance of *Trypanosoma cruzi* differentiation and selection, relationship with clinical and epidemiological varieties. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v. 18, n. 1, p. 9-16, 1985.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol. Res.**, v. 90, p. S19-S39, 2003.

RANG, H. P., RITTER, J. M., DALE, M. M., MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

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

REMME, J. H. F., BLAS, E., CHITSULO, L., DESJEUX, P. M. P., ENGERS, H. D., KANYOK, T. P., KAYONDO, J. F. K., ENGERS, H. D., KIOV, D. W., KUMARASWANI, V., LAZDINS, J. K., NUNN, P. P., ODUOLA, A., RIDLEY, R. G., TOURE, Y. T., ZICKER, F., MOREL, C. M. (2002) Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 421–426, 2002.

REY, L. **Parasitologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 884 p.

REZENDE, P. Relações quantitativas estrutura-atividade de derivados 5-nitro-2-tiofelidênicos: planejamento, síntese e determinação da atividade antimicrobiana frente a

cepas de *Staphylococcus aureus*. São Paulo, 2002. p.182. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

ROLLAS, S., GULERMAN, N., HABIBE, E. Synthesis and antimicrobial activity of some new hydrazones of 4-fluorobenzoic acid hydrazide and 3-acetil-2,5-disubstituted-1,3,4-oxadiazolines. **II Farmaco**, v. 57, p. 171 – 174, 2002.

SALUM, L. B. Estudos *in silico* no planejamento de candidatos a novos fármacos na terapia do câncer de mama e de reposição hormonal. São Carlos, 2007. 140 p. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Física de São Carlos – USP).

SELASSIE, C. D. History of Quantitative Structure-ACMTY relationships. In.: BURGER, A. WOLFF, M. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 6 ed. New York: Willey-Interscience. 1998. v. 1, p. 1 – 48.

SHORTER, J. Multiparameter extension of the Hammett equation In: **Correlation analysis in chemistry**: recents advances. New York: Plenum Press, 1978. Cap. 4, p. 119-173.

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

SOBRINHO, J. L. S., MEDEIROS, F. P. M., FELTS DE LA ROCA, M. SILVA, K., E., R., LIMA, L. N. A., NETO, P. J. R. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Rev. Pat. Trop.**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

STEINDEL M, DIAS, N., MENEZES, C., ROMANHA, A., SIMPSON, A., J., G. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 60, p. 71-80, 1983.

SWAAN, P. W. Membrane Transport proteins and drug transport. In.: BURGER, A. WOLFF, M. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 6 ed. New York: Willey-Interscience. 1998. v. 2, p. 249 – 294.

TAFT, R. W., LEWIS, J. C. The general applicability of a fixed scale of inductive effects. II. Inductive effect of dipolar substituents in the reactivities of *m*- and *p*-substituted derivatives of benzene. **J. Am. Chem Soc.** Washington, v. 80, n. 10, p. 2436 – 2443, 1958.

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

TAVARES, L. C. Relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade antimicrobiana de análogos à nifuroxazida. São Paulo, 1993. 186 p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo)

TAYLOR, P. J. Computer-Assisted Drug Design. In:Hansch, C. **Comprehensive Medicinal Chemistry**: the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds, v.4. Oxford: Pergamon Press, 1990, p. 43-64.

TROPSHA, A. Recent Trends in Quantitative Structure Activity Relationships In.: BURGER, A. WOLFF, M. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 6 ed. New York: Wiley-Interscience. 1998. v. 1, p. 49 – 76.

TUTE, M. S. Principles and practice of Hansch analysis: a guide to structure-activity correlation for medicinal chemistry. **Adv. Drug Res.**, London, v. 6, p. 1-77, 1971.

UNITED STATES GOVERNMENT ACCOUNTABILITY OFFICE (2006). New drug development. Science, business, regulatory, and intellectual property issue cited as hampering drug development efforts. Disponível em: <<http://www.gao.gov/new.items/d0749.pdf>>. Acesso em: 27 out 2010.

URBINA, J. A., DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 495-501, 2004.

URBINA, J. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, 1999, 349-355, 1999.

VERLOOP, A.; HOOGENSTRAATEN, W.; TIPKER, J. Development and application of new steric substituent parameters in drug design. In: ARIENS, E. J. **Drug Design**, New York: Academic Press: 1976, v. 7, p. 165-207.

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

WERMUTH, C. G. **The practice of Medicinal Chemistry**. London: Academic Press, 2003, 768 p.

WHO. Chagas disease. Seven tenth programme report UNDP/TDR. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2005. Disponível em: http://www.who.int/tdr/old/publications/publications/pdf/swg_chagas.pdf. Acesso em 20 de fevereiro de 2011.

WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/en/>. Acesso em: 2 de fevereiro de 2011.

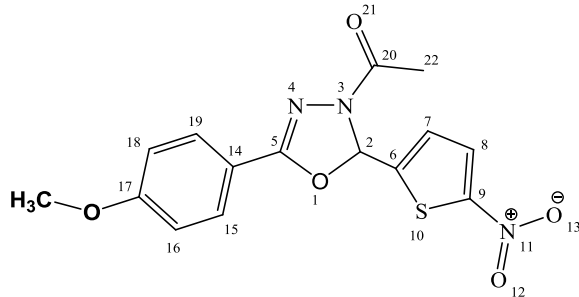
WHO<http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html> Acesso em: 05 fevereiro, 2011.

WHO. The World Health Report: changing history. Geneva: World Health Organization, 2004, p. 1-167. Disponível em: <<http://www.who.int/whr/2004/en/>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2011.

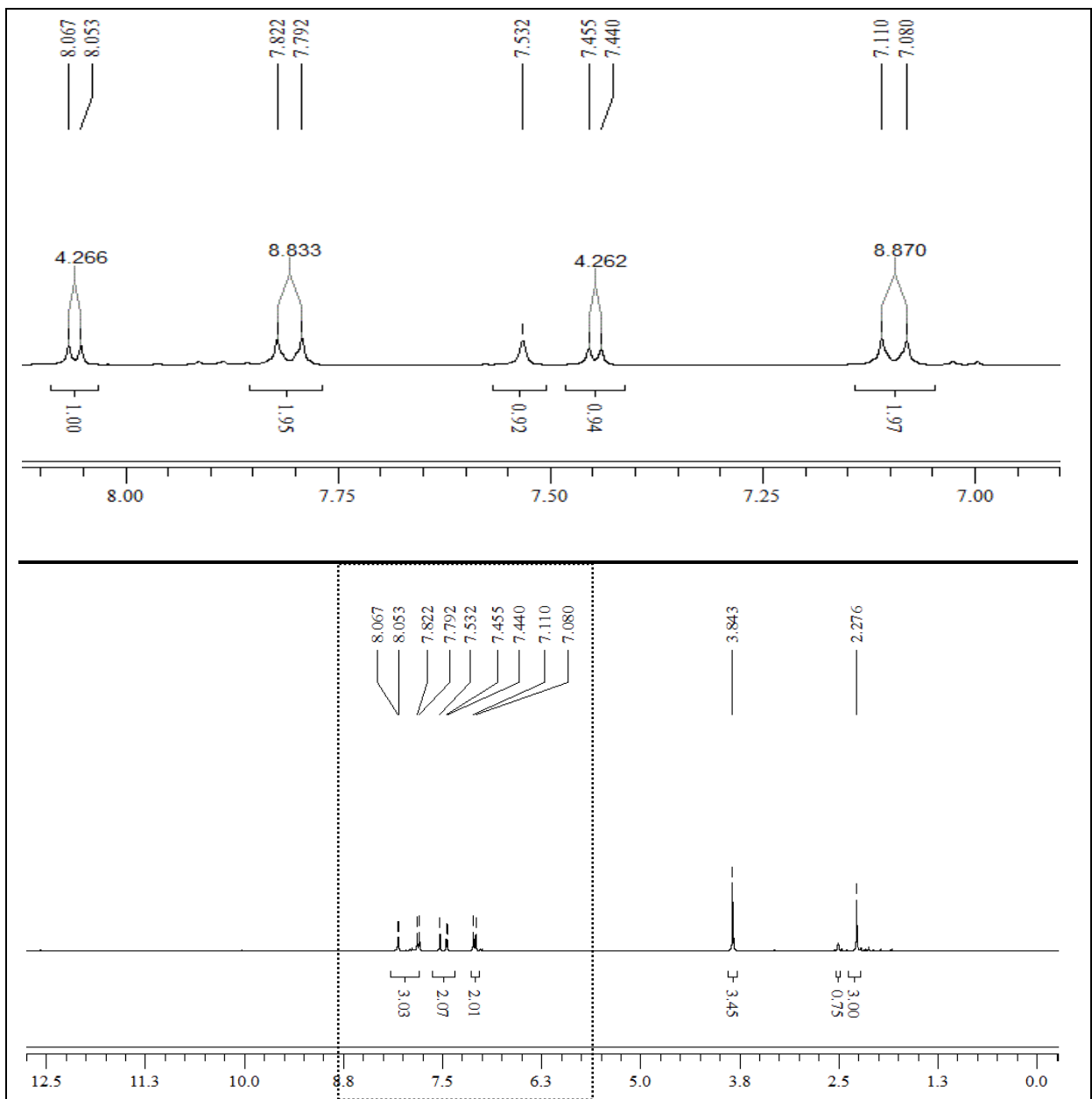
9 ANEXO: ESPECTROS DE RMN ¹H E RMN ¹³C DA SÉRIE DE COMPOSTOS DE DERIVADOS 1,3,4-OXADIAZOLÍNICOS

9.1 ANEXO A: Espectros de RMN ¹H da série 2-[5-nitro-tiofeno-2- il]-3-acetil-5[4-fenil-R-substituídas]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas

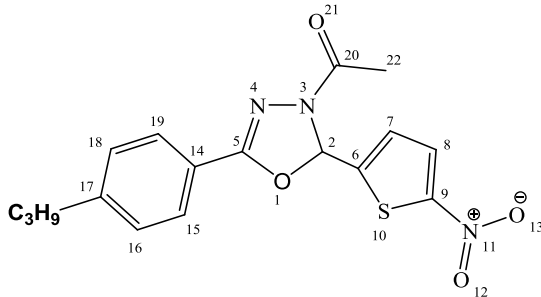
Espectros de RMN ^1H de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-metoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



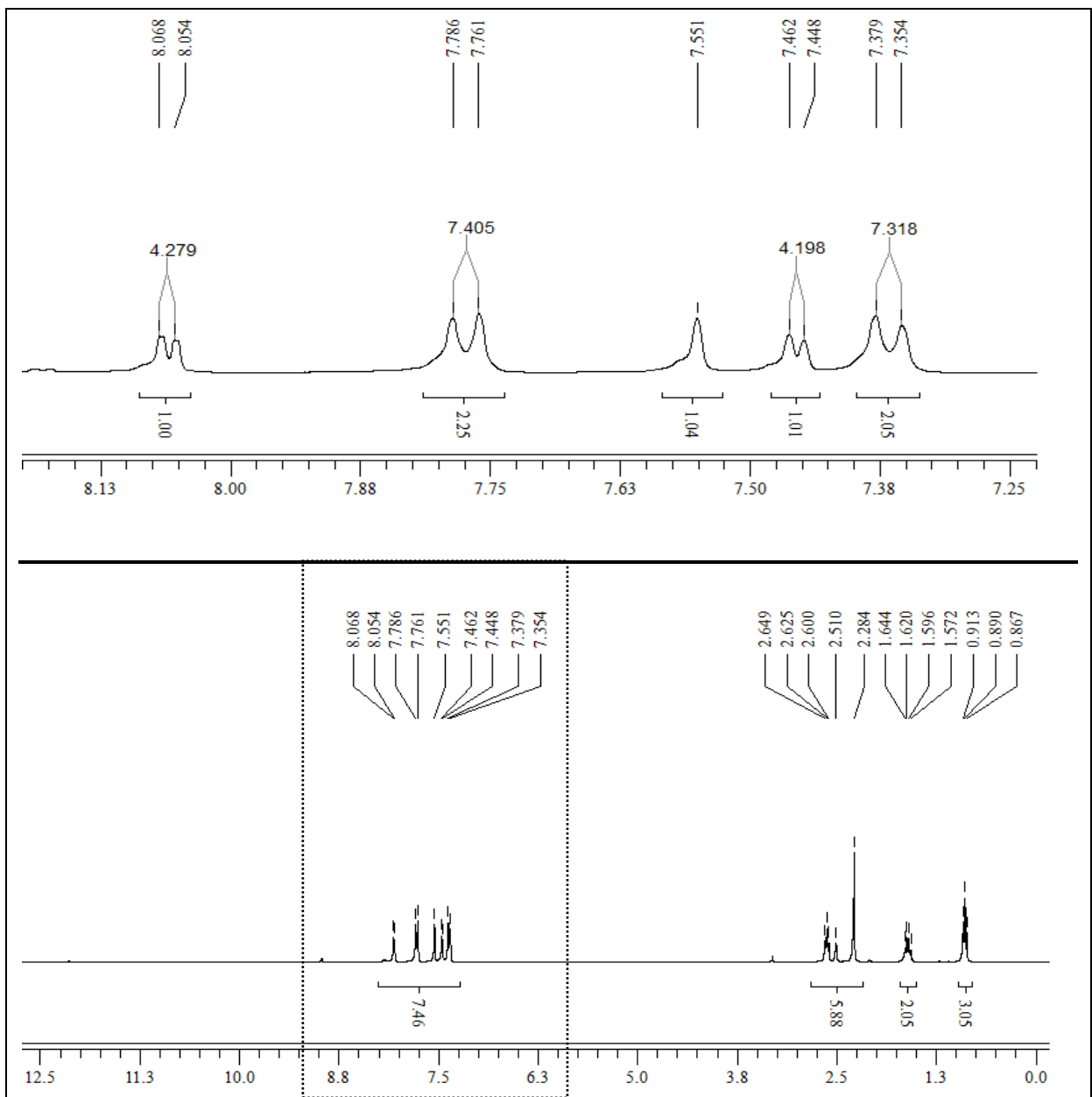
RMN ^1H (DMSO - d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 8,06 (d, 1H, H₈, $J = 4,3$); 7,81 (d, 2H, H_{15/19}, $J = 8,8$ Hz), 7,53 (s, 1H, H₂), 7,45 (d, H₇, $J = 4,3$ Hz), 7,10 (d, 2H, H_{18/16}, $J = 8,8$ Hz), 3,84 (s, 3H, OCH₃), 2,28 (s, 3H, H₂₂).



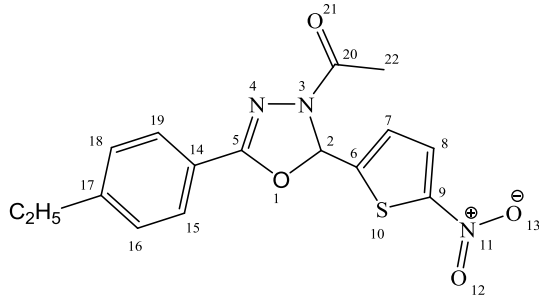
Espectros de RMN ¹H de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-propil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO-*d*₆- padrão de referência interna: TMS



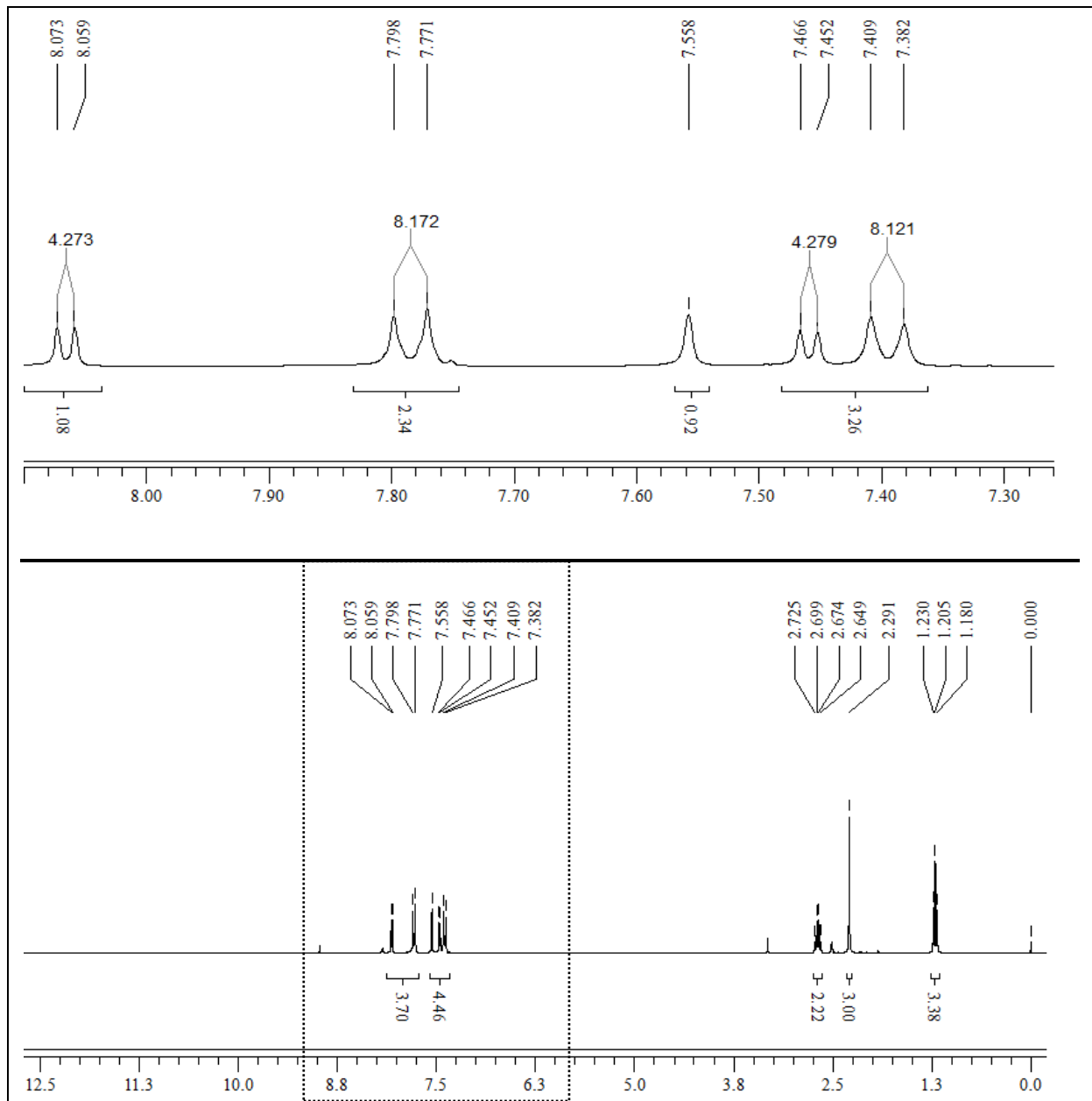
RMN ¹H (DMSO - *d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 8,06 (d, 1H, H₈, *J* = 4,3); 7,77 (d, 2H, H_{15/19}, *J* = 7,4 Hz), 7,55 (s, 1H, H₂), 7,46 (d, H₇, *J* = 4,2 Hz), 7,36 (d, 2H, H_{18/16}, *J* = 7,3 Hz), 2,62 (t, 2H, CH₂, *J* = 7,4 Hz); 2,28 (s, 3H, H₂₂); 1,61 (m, 2H, CH₂, *J* = 7,3 Hz); 0,89 (t, 3H, CH₃, *J* = 7,3)



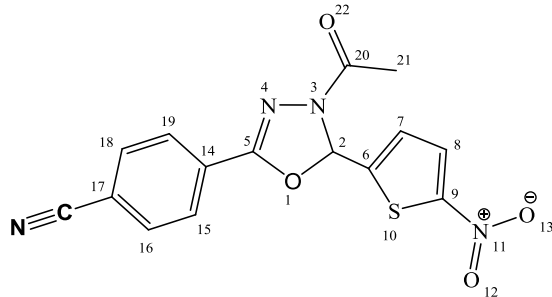
Espectros de RMN ^1H de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-etil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: $\text{DMSO}-d_6$ - padrão de referência interna: TMS



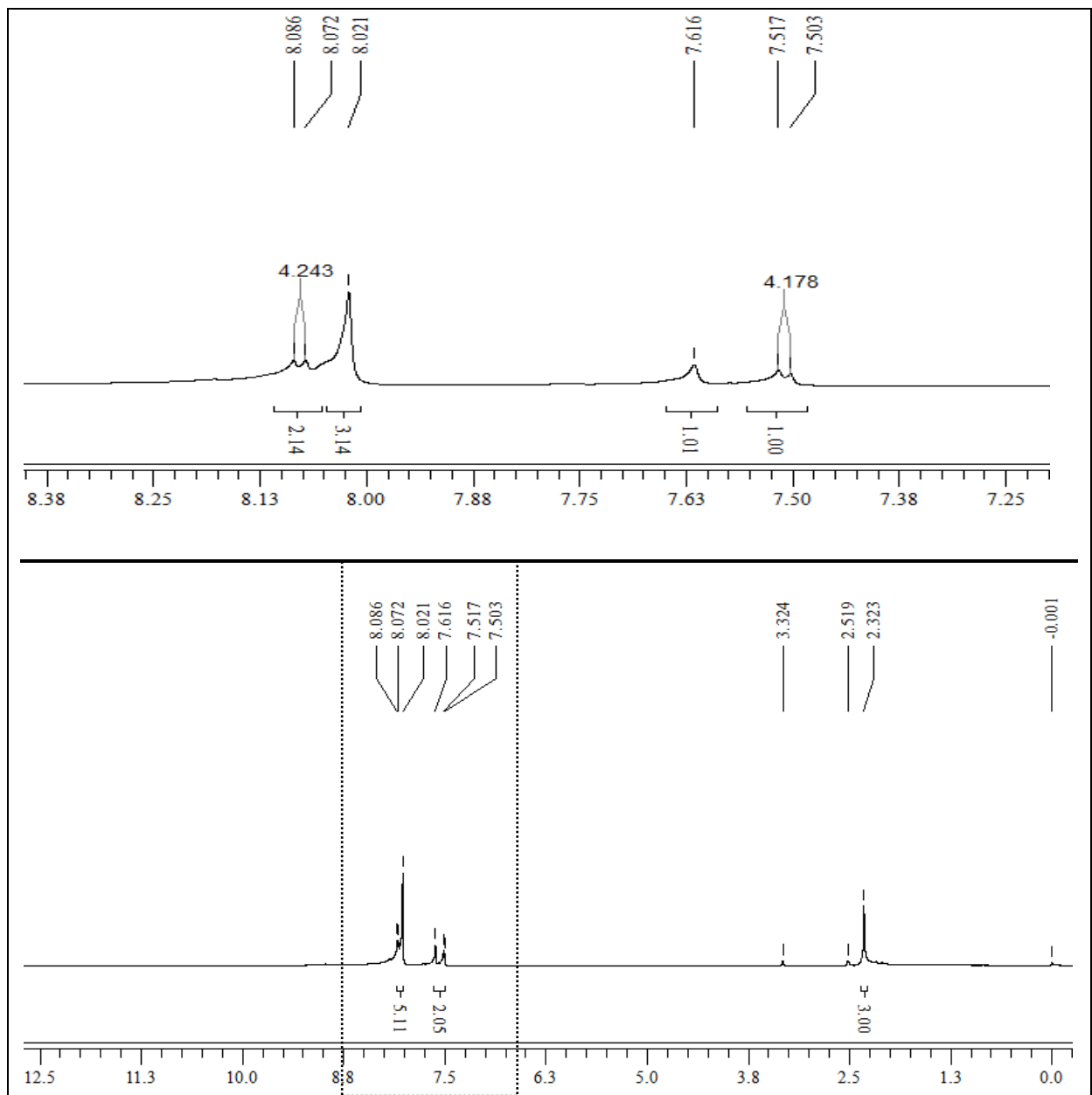
RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ (ppm): 8,07 (d, 1H, H_8 , $J = 4,3$); 7,78 (d, 2H, $\text{H}_{15/19}$, $J = 8,2$ Hz), 7,56 (s, 1H, H_2), 7,46 (d, 1H, H_7 , $J = 4,3$ Hz), 7,40 (d, 2H, $\text{H}_{18/16}$, $J = 8,1$ Hz), 2,69 (m, 2H, CH_2 , $J = 7,5$ Hz), 2,29 (s, 3H, H_{22}), 1,21 (t, 3H, CH_3 , $J = 7,5$ Hz).



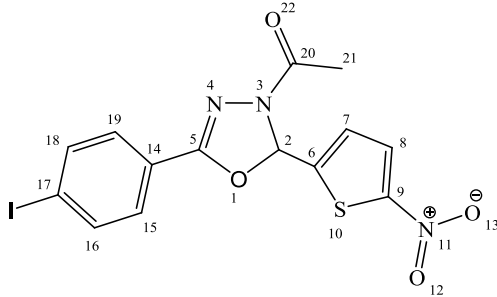
Espectros de RMN ^1H de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-ciano]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



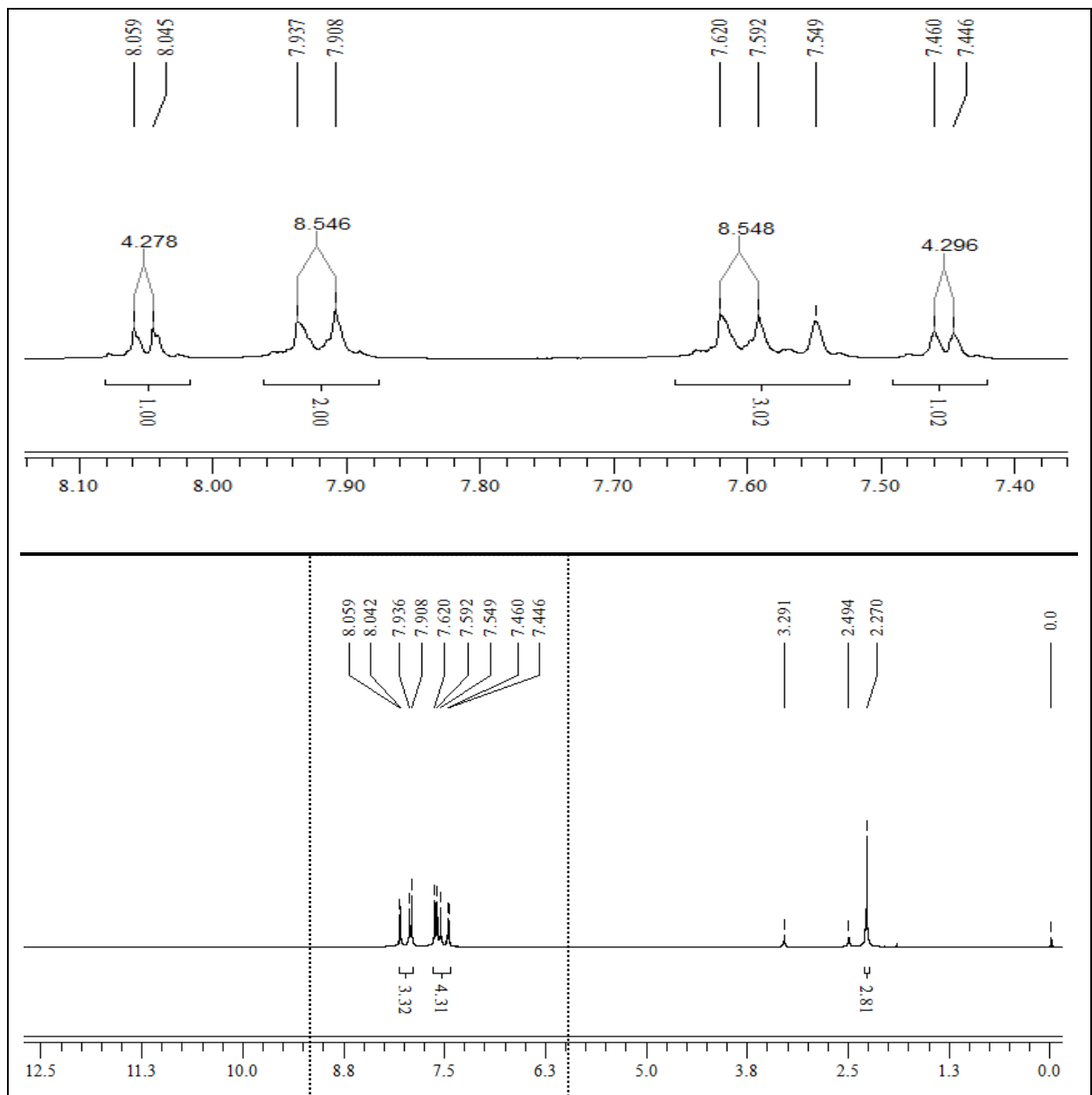
RMN ^1H (DMSO - d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 8,08 (d, 2H, $\text{H}_{15/19}$, $J = 4,2$); 8,02 (s, 3H, $\text{H}_{18/16}$ e H_8); 7,62 (s, 1H, H_2), 7,51 (d, H_7 , $J = 4,2$ Hz); 2,32 (3H, H_{22}).



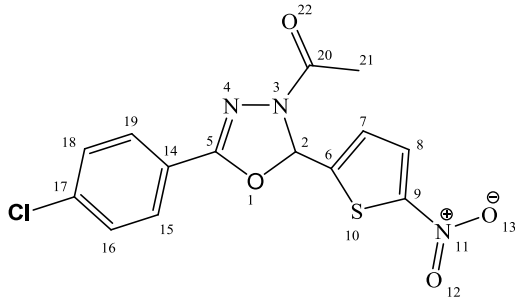
Espectros de RMN ^1H de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-iodo]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



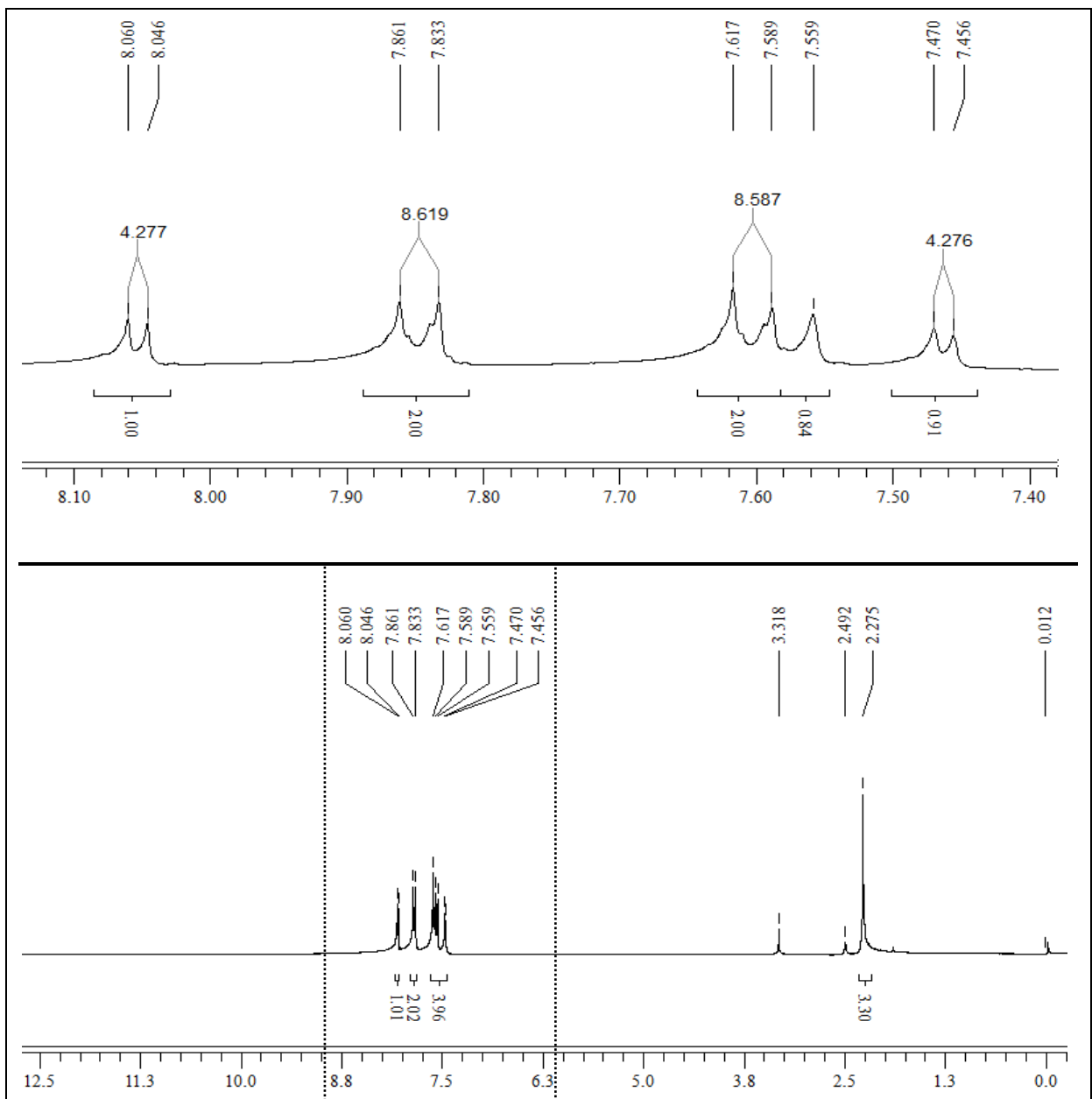
RMN ^1H (DMSO - d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 8,05 (d, 1H, H₈, $J = 4,3$); 7,92 (d, 2H, H_{15/19}, $J = 8,5$ Hz); 7,61 (d, 2H, H_{18/16}, $J = 8,5$ Hz), 7,55 (s, 1H, H₂), 7,45 (d, H₇, $J = 4,3$ Hz), 2,27 (3H, H₂₂).



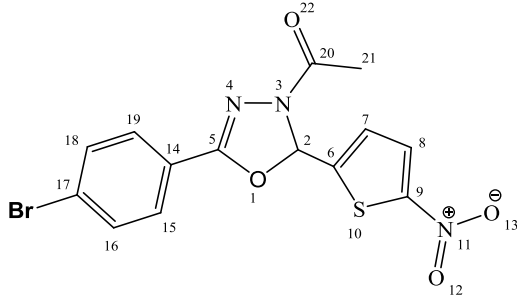
Espectros de RMN ^1H de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-cloro]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: $\text{DMSO-}d_6$ - padrão de referência interna: TMS



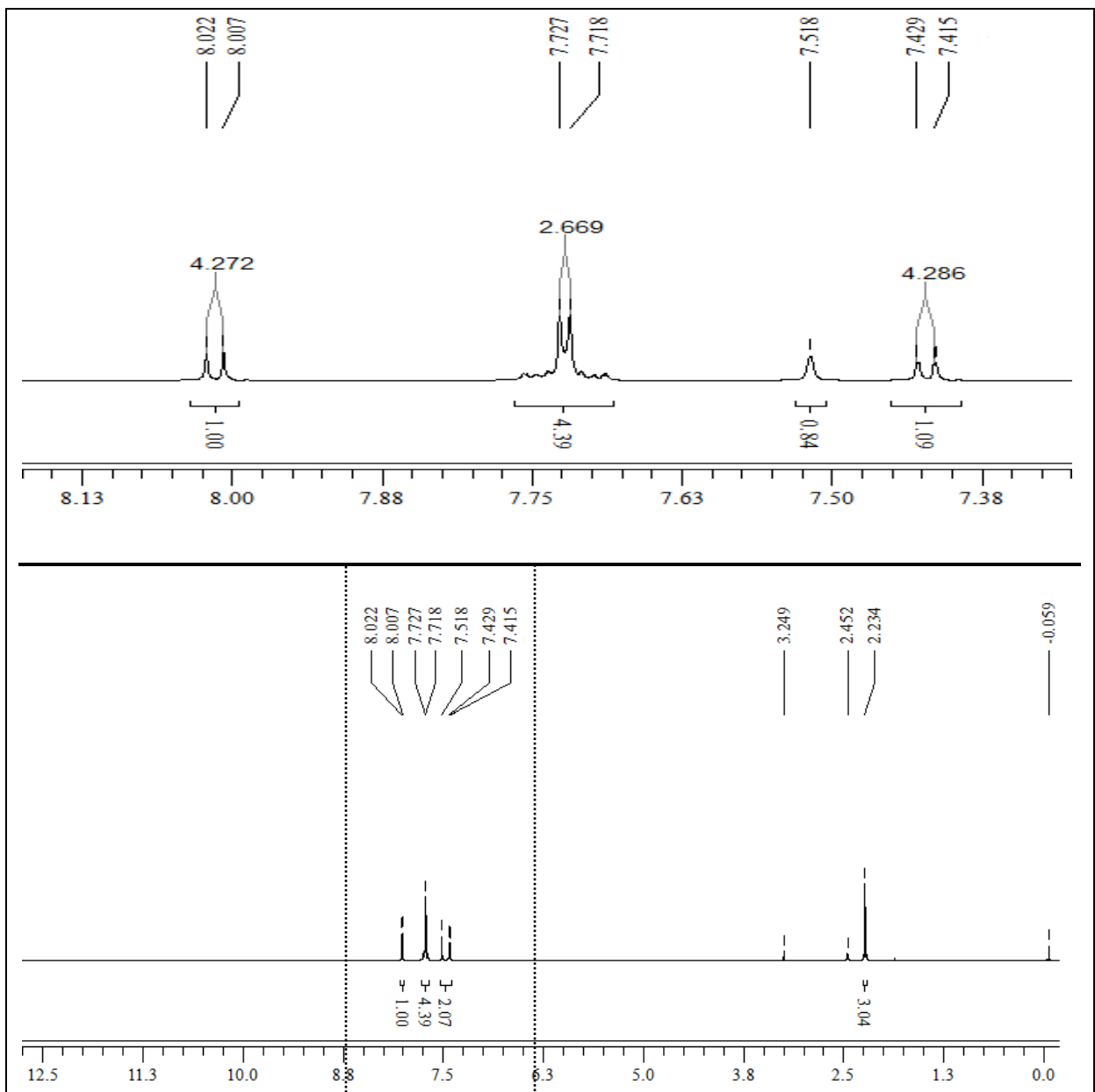
RMN ^1H ($\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz): δ (ppm): 8,05 (d, 1H, H_8 , $J = 4,3$); 7,85 (d, 2H, $\text{H}_{15/19}$, $J = 8,6$ Hz), 7,60 (d, 2H, $\text{H}_{18/16}$, $J = 8,6$ Hz) 7,56 (s, 1H, H_2), 7,46 (d, H_7 , $J = 4,3$ Hz), 2,27 (3H, H_{22}).



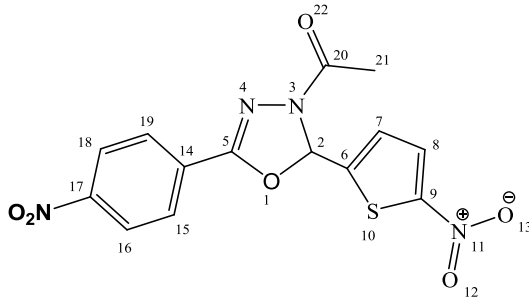
Espectros de RMN ^1H de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-bromo]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



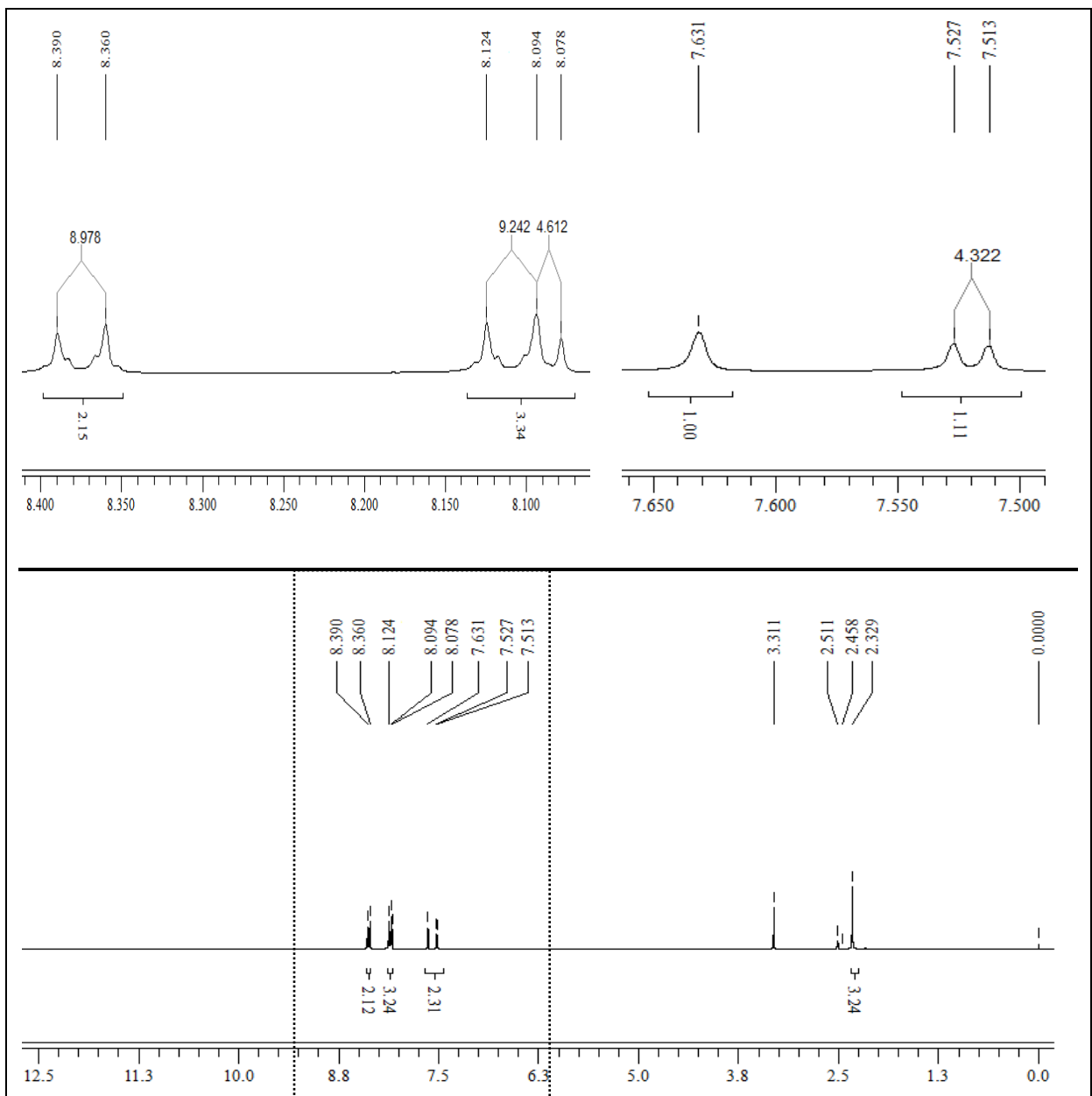
RMN ^1H (DMSO - d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 8,01 (d, 1H, H_8 , $J = 4,3$); 7,72 (d, 4H, $\text{H}_{15/19}$ e $\text{H}_{18/16}$, $J = 2,7$ Hz), 7,52 (s, 1H, H_2); 7,42 (d, H_7 , $J = 4,3$ Hz), 2,23 (3H, H_{22}).



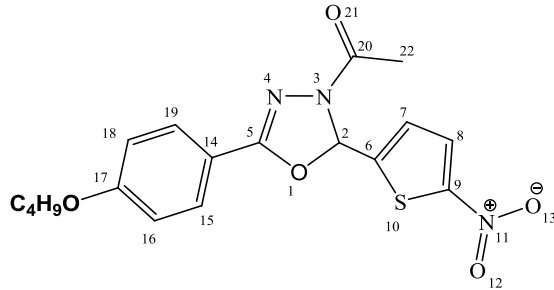
Espectros de RMN ¹H de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-nitro]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO-*d*₆- padrão de referência interna: TMS



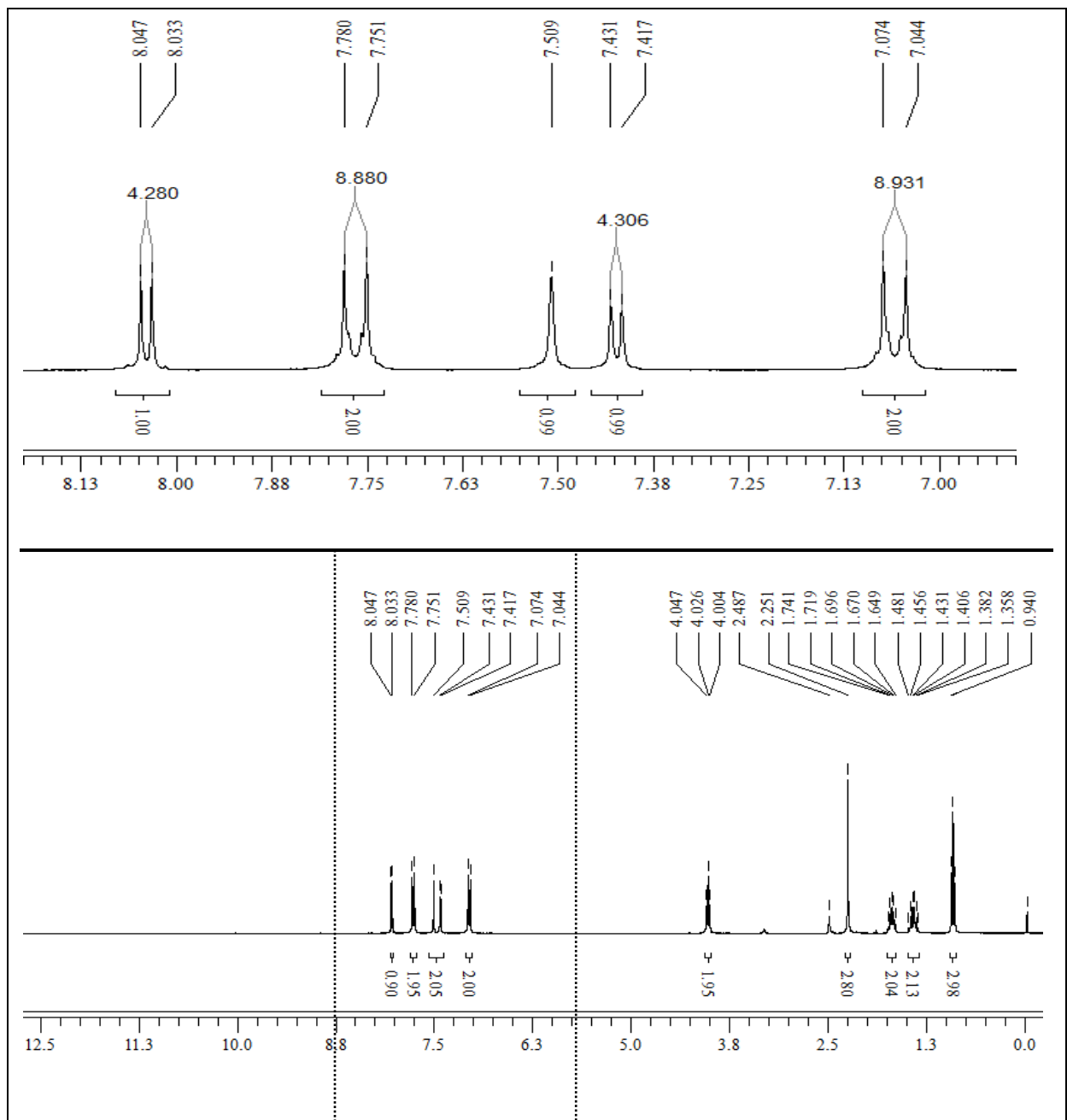
RMN ¹H (DMSO - *d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 8,40 (d, 2H, H_{16/18}, $J = 9,0$); 8,11 (d, 2H, H_{15/19}, $J = 9,0$ Hz); 8,07 (d, 1H, H₈, $J = 4,6$ Hz) 7,63 (s, 1H, H₂); 7,52 (d, H₇, $J = 4,3$ Hz); 2,33 (3H, H₂₂).



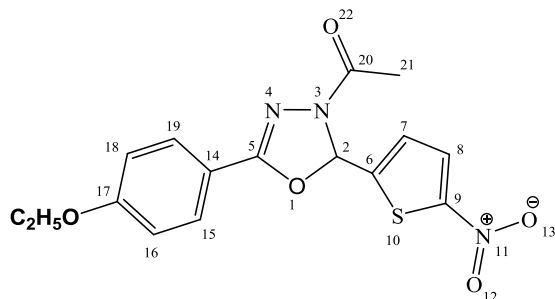
Espectros de RMN ^1H de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-butoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: $\text{DMSO}-d_6$ - padrão de referência interna: TMS



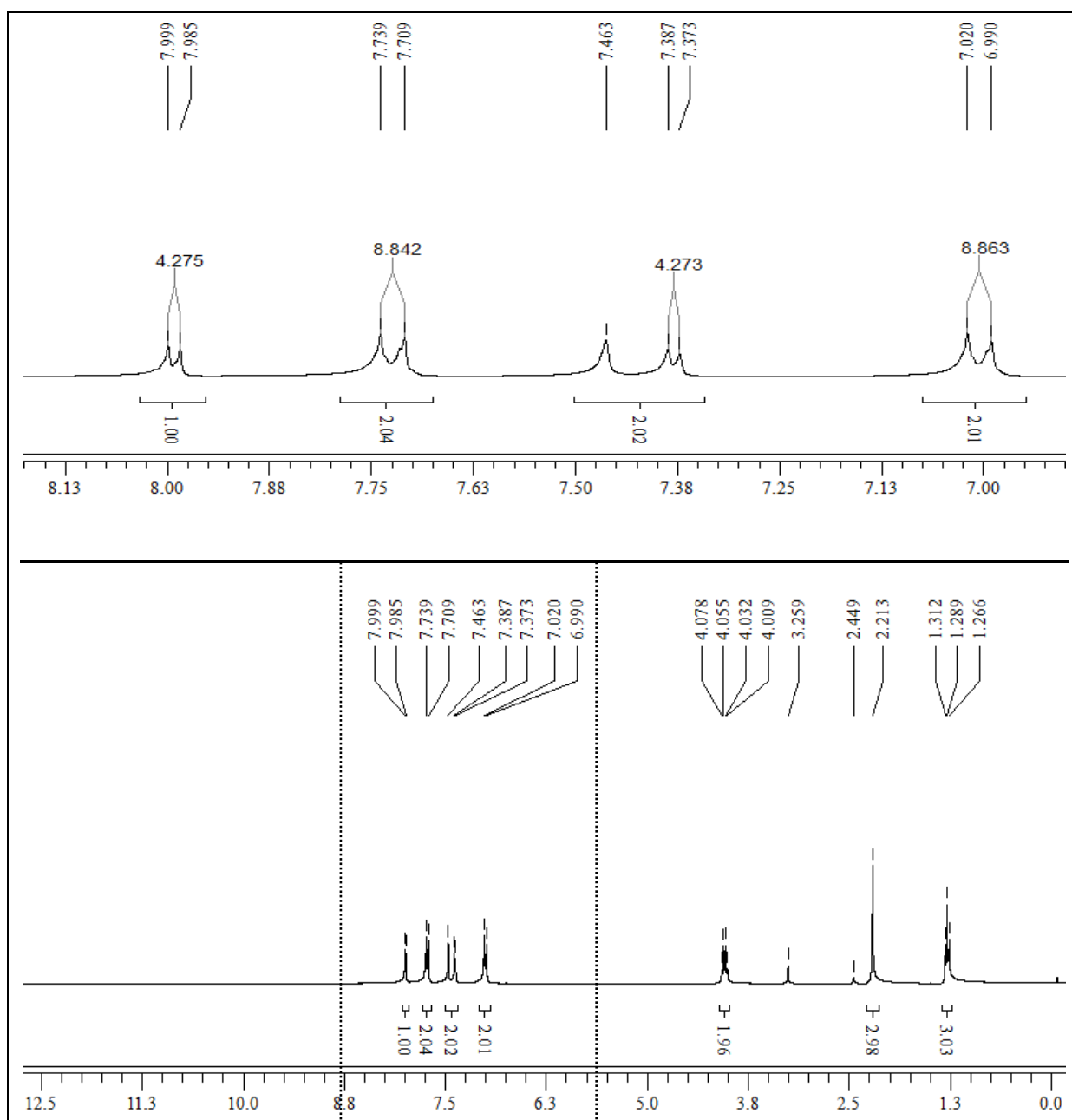
RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ (ppm): 8,04 (d, 1H, H_8 , $J = 4,3$); 7,77 (d, 2H, $\text{H}_{15/19}$, $J = 8,9$ Hz); 7,51 (s, 1H, H_2); 7,42 (d, H_7 , $J = 4,3$ Hz); 7,06 (d, 2H, $\text{H}_{18/16}$, $J = 8,9$ Hz); 4,03 (t, 2H, OCH_2 , $J = 6,5$ Hz); 2,25 (s, 3H, H_{22}); 1,70 (m, 2H, CH_2 , $J = 7,0$); 1,42 (m, CH_2 , $J = 7,4$); 0,92 (t, CH_3 , $J = 7,4$ Hz).



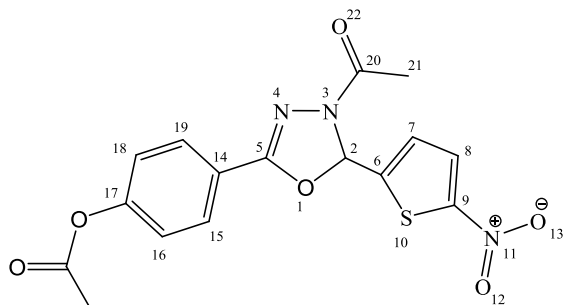
Espectros de RMN ¹H de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-etoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO-*d*₆- padrão de referência interna: TMS



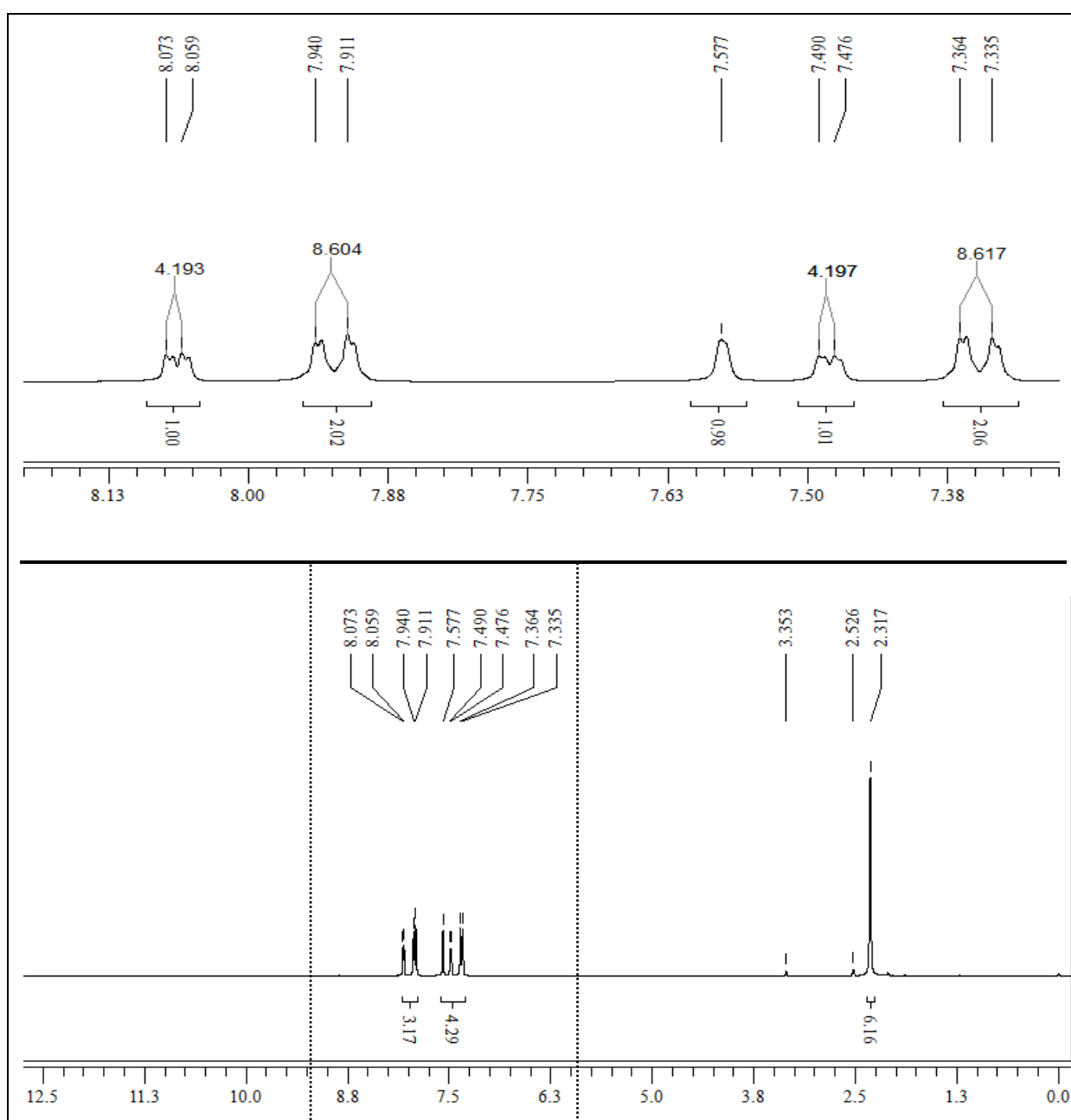
RMN ¹H (DMSO - *d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 7,99 (d, 1H, H₈, *J* = 4,3); 7,72 (d, 2H, H_{15/19}, *J* = 8,9 Hz); 7,46 (s, 1H, H₂); 7,38 (d, H₇, *J* = 4,3 Hz); 7,00 (d, 2H, H_{18/16}, *J* = 8,9 Hz); 4,04 (m, OCH₂, *J* = 6,9 Hz); 2,21 (3H, H₂₂) 1,29 (t, CH₃, *J* = 6,9 Hz).



Espectros de RMN ^1H de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-acetoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS

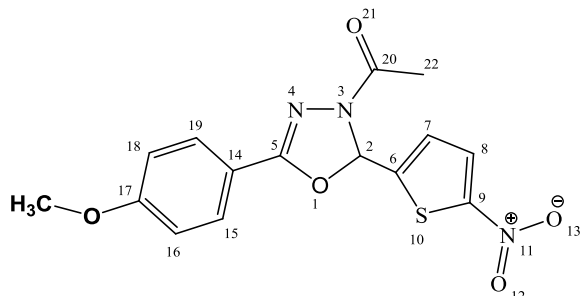


RMN ^1H (DMSO - d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 8,06 (d, 1H, H_8 , $J = 4,3$); 7,93 (d, 2H, $\text{H}_{16/18}$, $J = 8,6$ Hz); 7,57 (s, 1H, H_2); 7,48 (d, H_7 , $J = 4,3$ Hz); 7,35 (d, 2H, $\text{H}_{15/19}$, $J = 8,6$ Hz); 2,32 (6H, H_{22} e OCOCH_3).

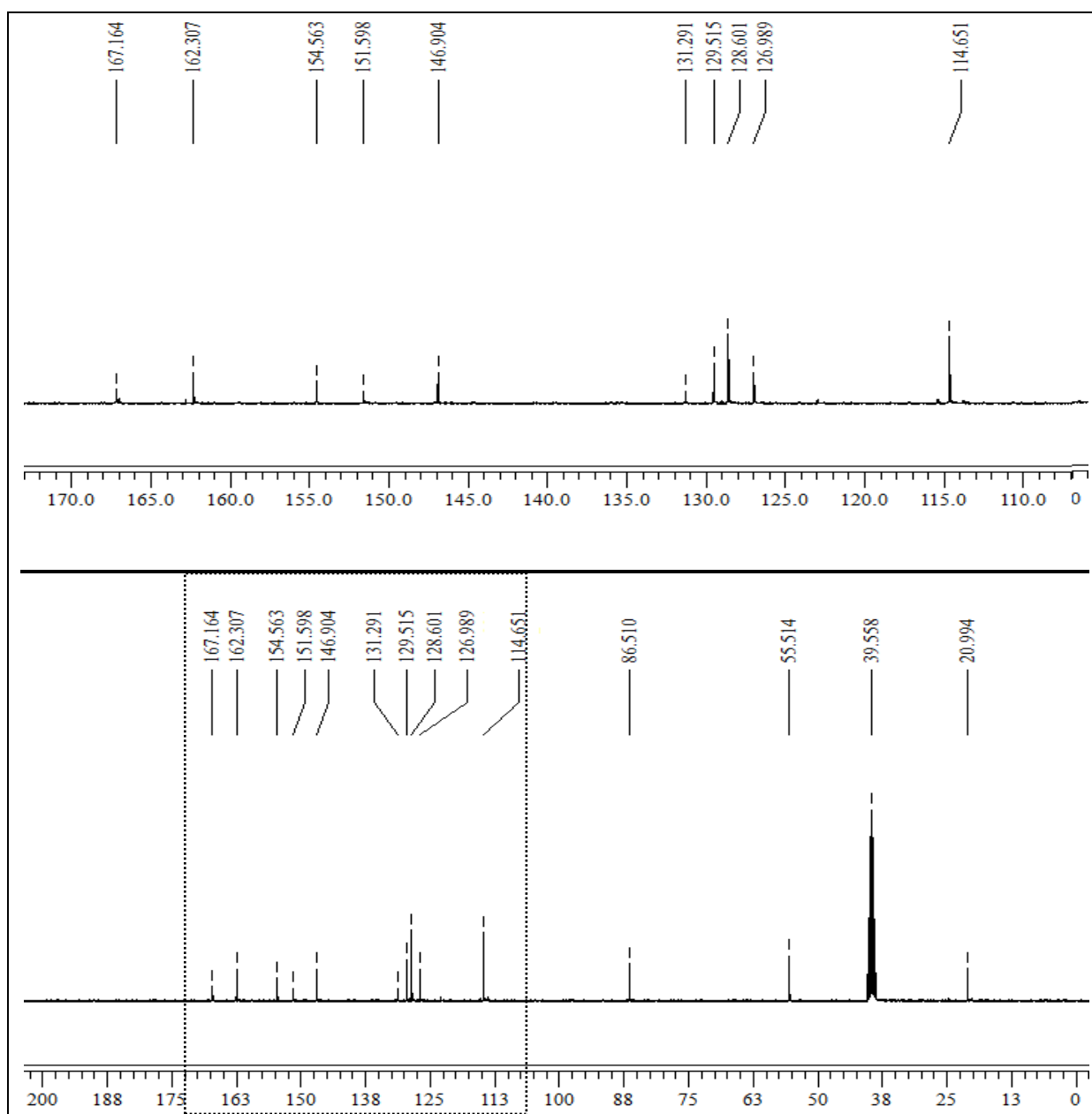


9.2 ANEXO B: Espectros de RMN ^{13}C da série 2-[5-nitro-tiofeno-2- il]-3-acetil-5[4-fenil-R-substituídas]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazolinas

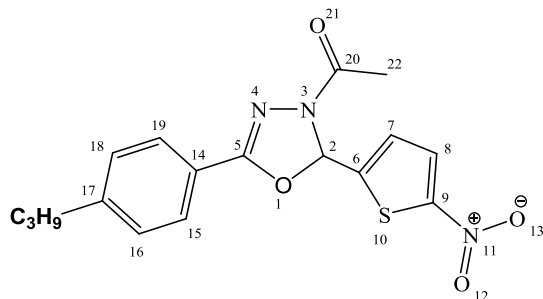
Espectros de RMN ^{13}C de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-metoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



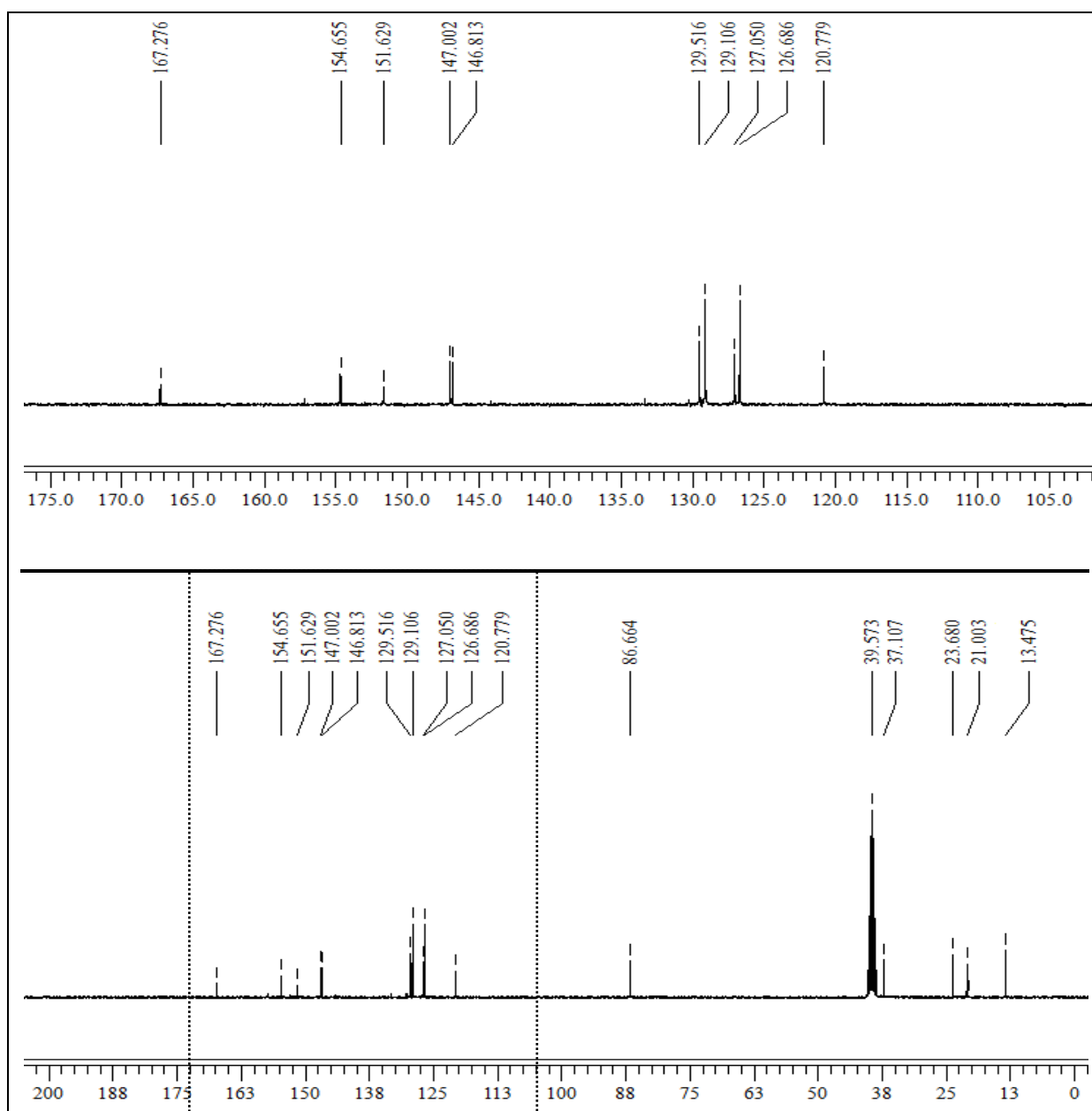
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 167,1 (C20), 162,3 (C17), 154,6 (C5), 151,6 (C6), 146,9 (C9), 131,3 (C8), 129,5 (C7), 128,6 (C15,C19), 127,0 (C14), 115,7 (C16,C18), 86,6 (C2), 55,5 (OCH $_3$), 21,0 (C22).



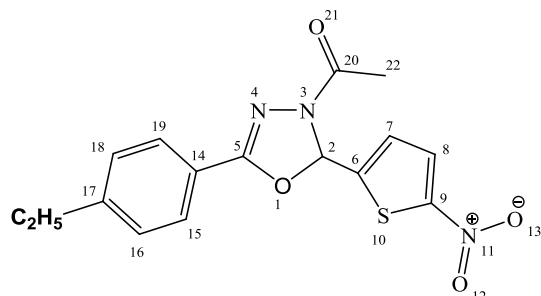
Espectros de RMN ^{13}C de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-propil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



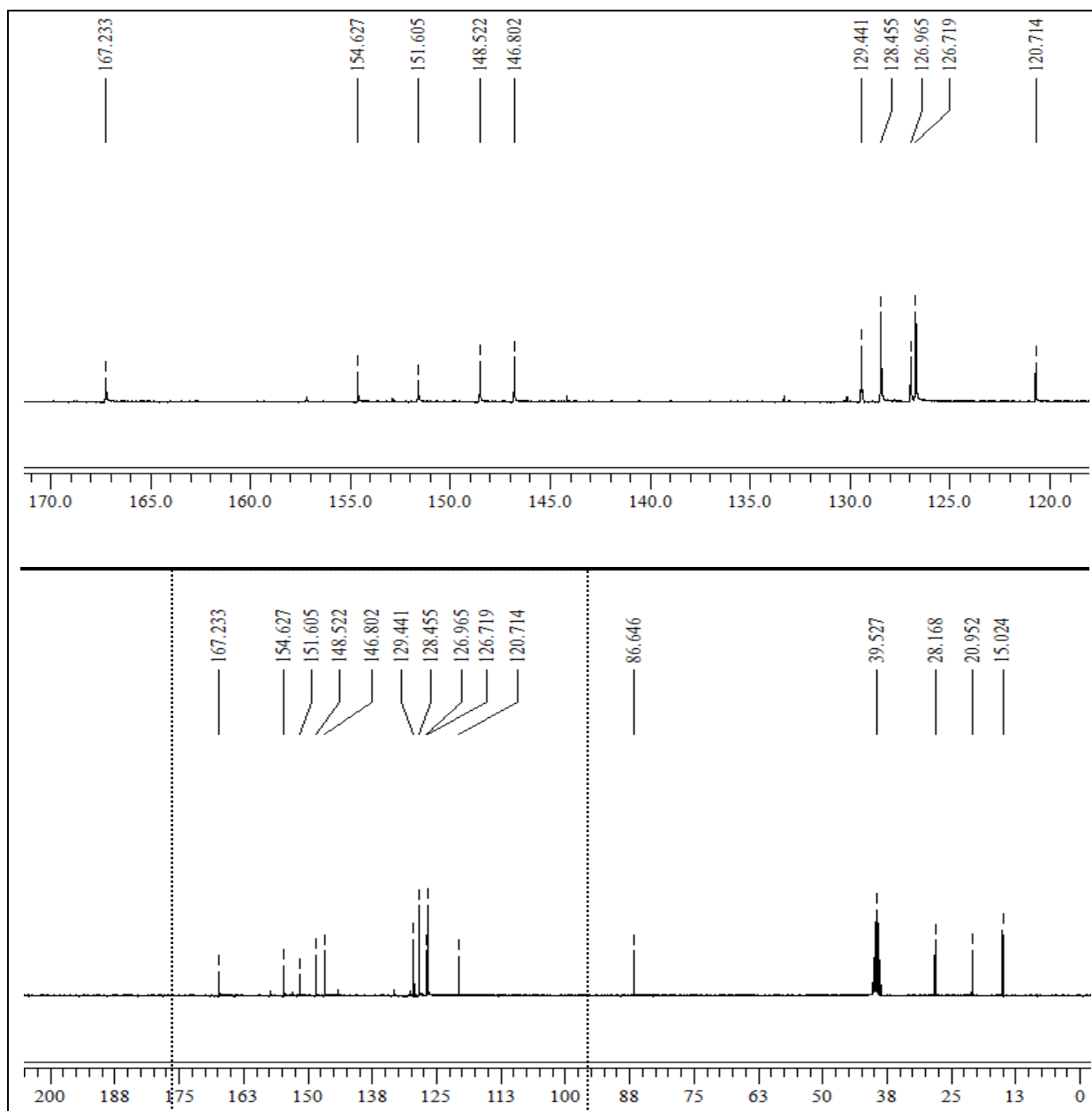
RMN ^{13}C (DMSO - d_6 , 75 MHz) δ (ppm):
 167,3 (C20), 154,7 (C5), 151,6 (C6), 147,0 (C9), 146,8 (C17), 130,0 (C14), 129,1 (C15,19), 127,1 (C8), 126,7 (C16, C18), 120,8 (C7), 86,7 (C2), 37,1 (CH₂), 23,7 (CH₂), 21,0 (C22), 13,5 (CH₃).



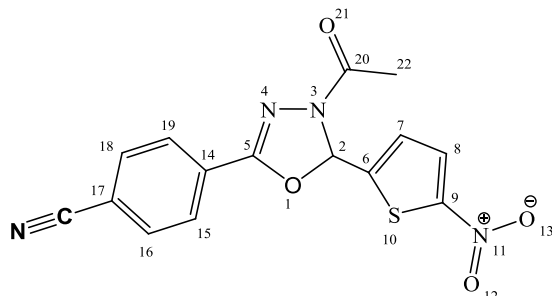
Espectros de RMN ^{13}C de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-etil]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



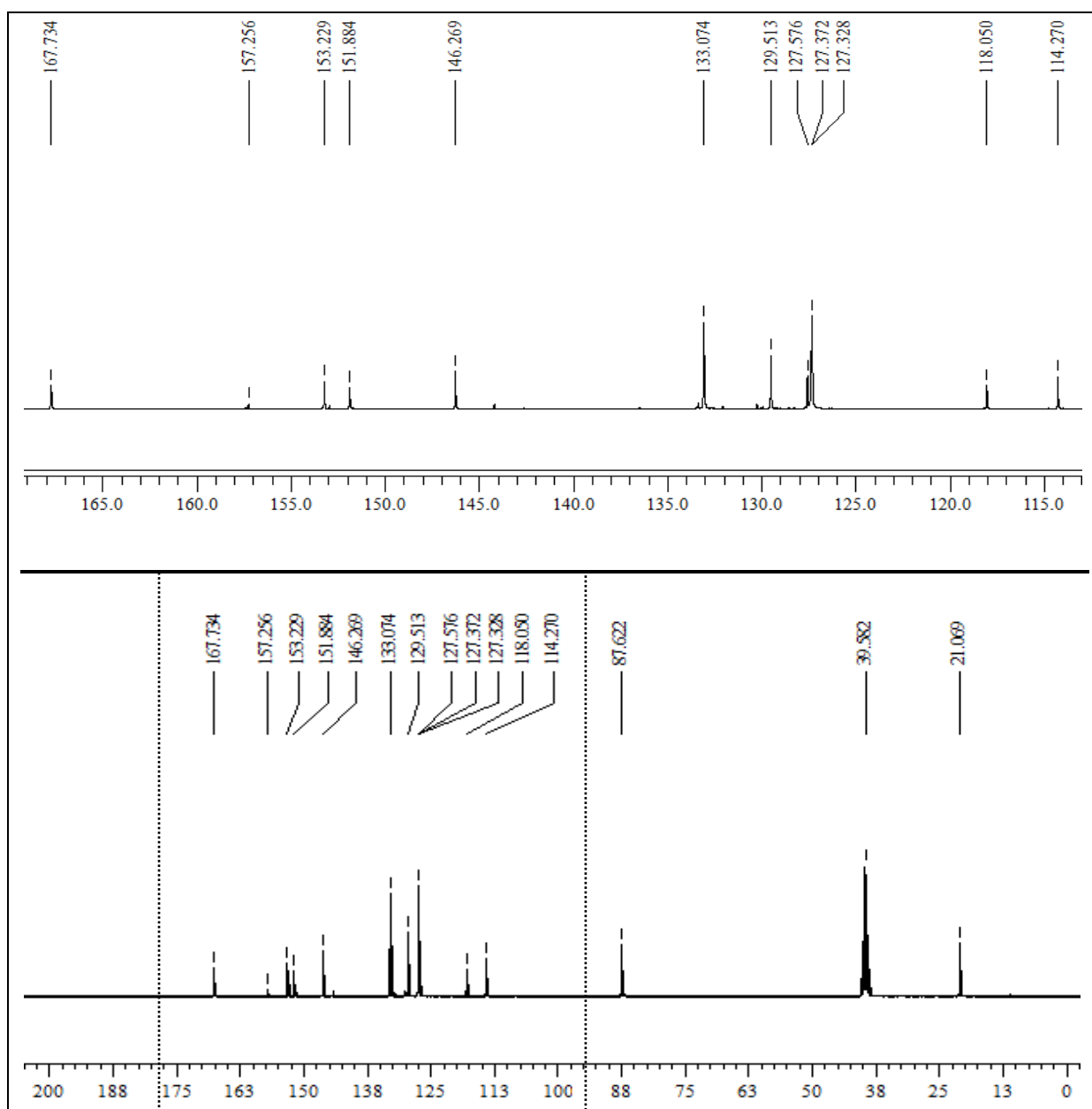
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 167,2 (C20), 154,6 (C5), 151,6 (C6), 148,5 (C9), 146,8 (C17), 129,4 (C14), 128,5 (C15/19), 127,0 (C8), 126,7 (C16, C18), 120,7 (C7), 86,6 (C2), 28,2 (CH₂), 21,0 (C22), 15,0 (CH₃).



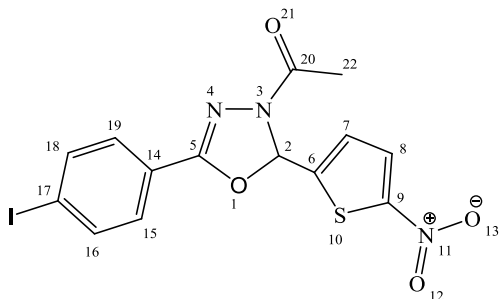
Espectros de RMN ^{13}C de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-ciano]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



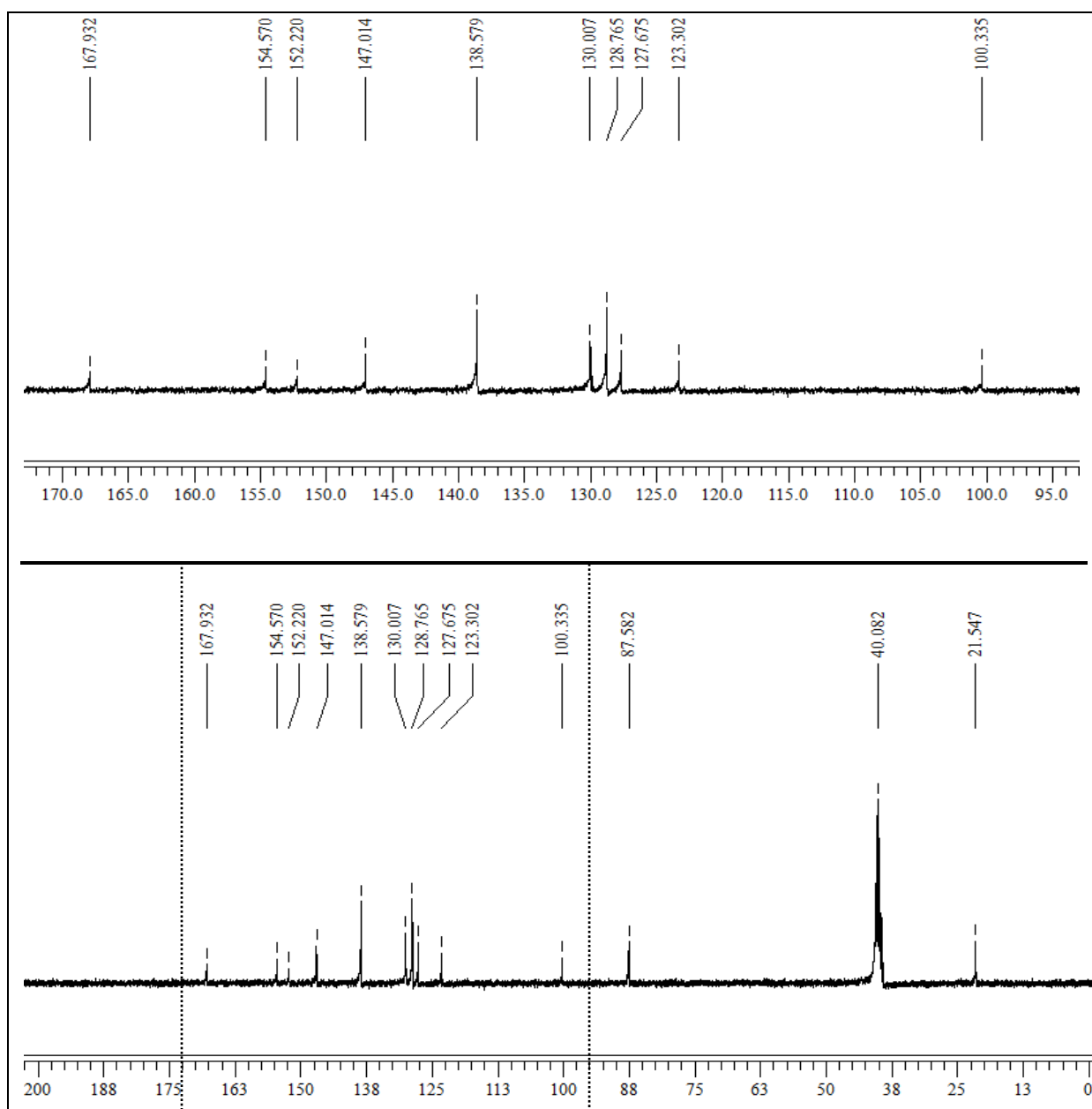
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 167,7 (C20), 157,3 (C5), 153,2 (C6), 152,0
 (C9), 146,3 (C14), 133,0 (C16,C18), 129,5
 (C8), 127,5 (C7), 127,3 (C15,C19), 118,0
 (CN), 114,3 (C17), 87,6 (C2), 21,1 (C22)



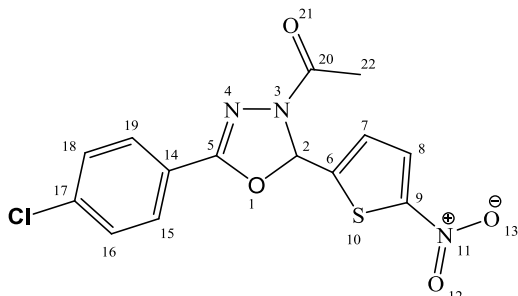
Espectros de RMN ^{13}C de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-iodo]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: $\text{DMSO-}d_6$ - padrão de referência interna: TMS



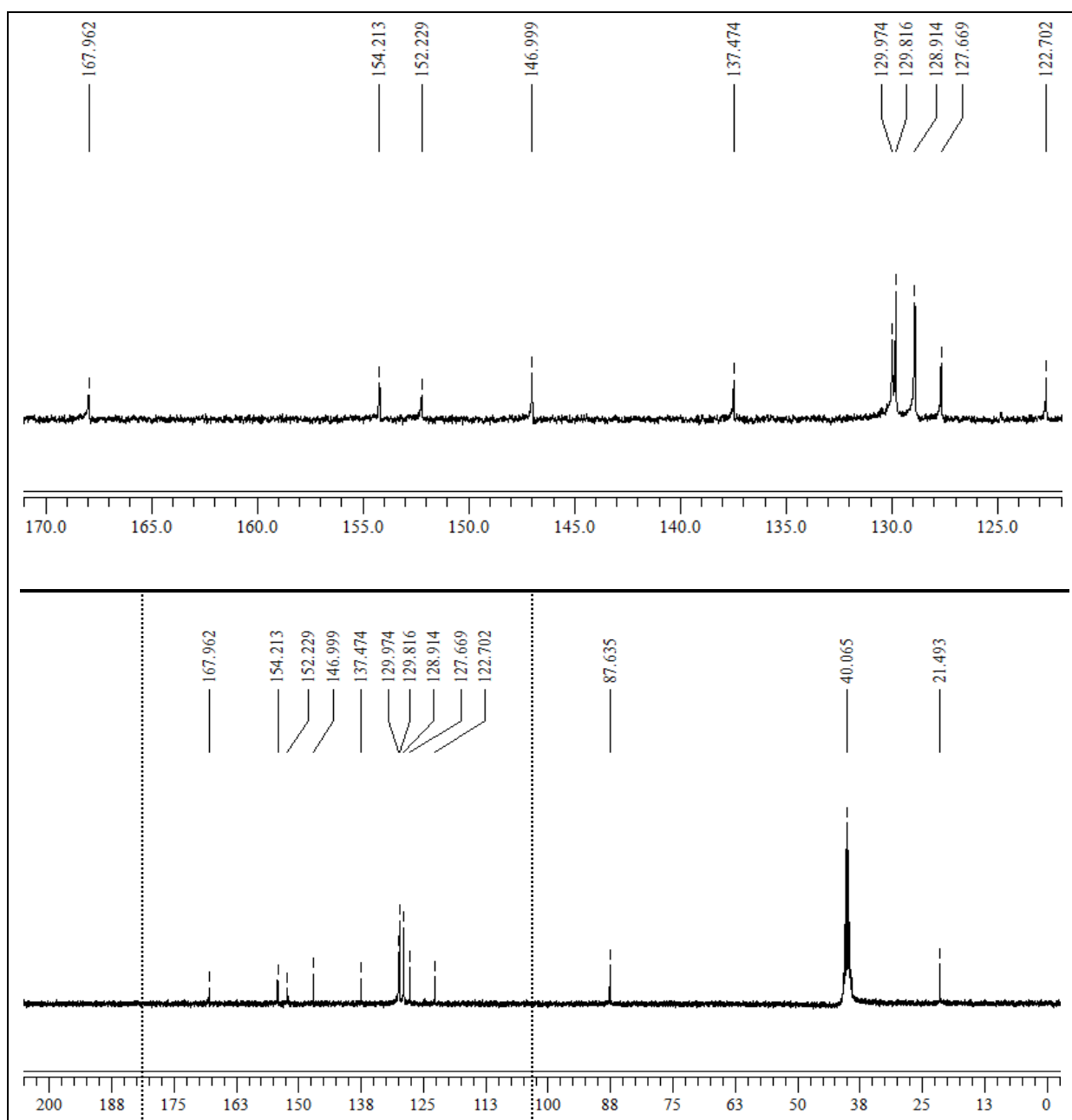
RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz): δ (ppm):
 167,9 (C20), 154,6 (C5), 152,2 (C6), 147,0
 (C9), 138,5 (C17), 130,0 (C14), 128,8
 (C15,C19), 127,7 (C16,C18), 123,3 (C8),
 100,3 (C7), 87,6 (C2), 21,5 (C22)



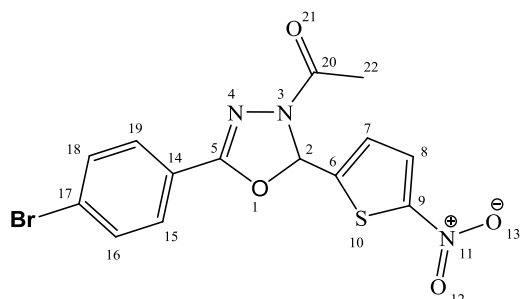
Espectros de RMN ^{13}C de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-cloro]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



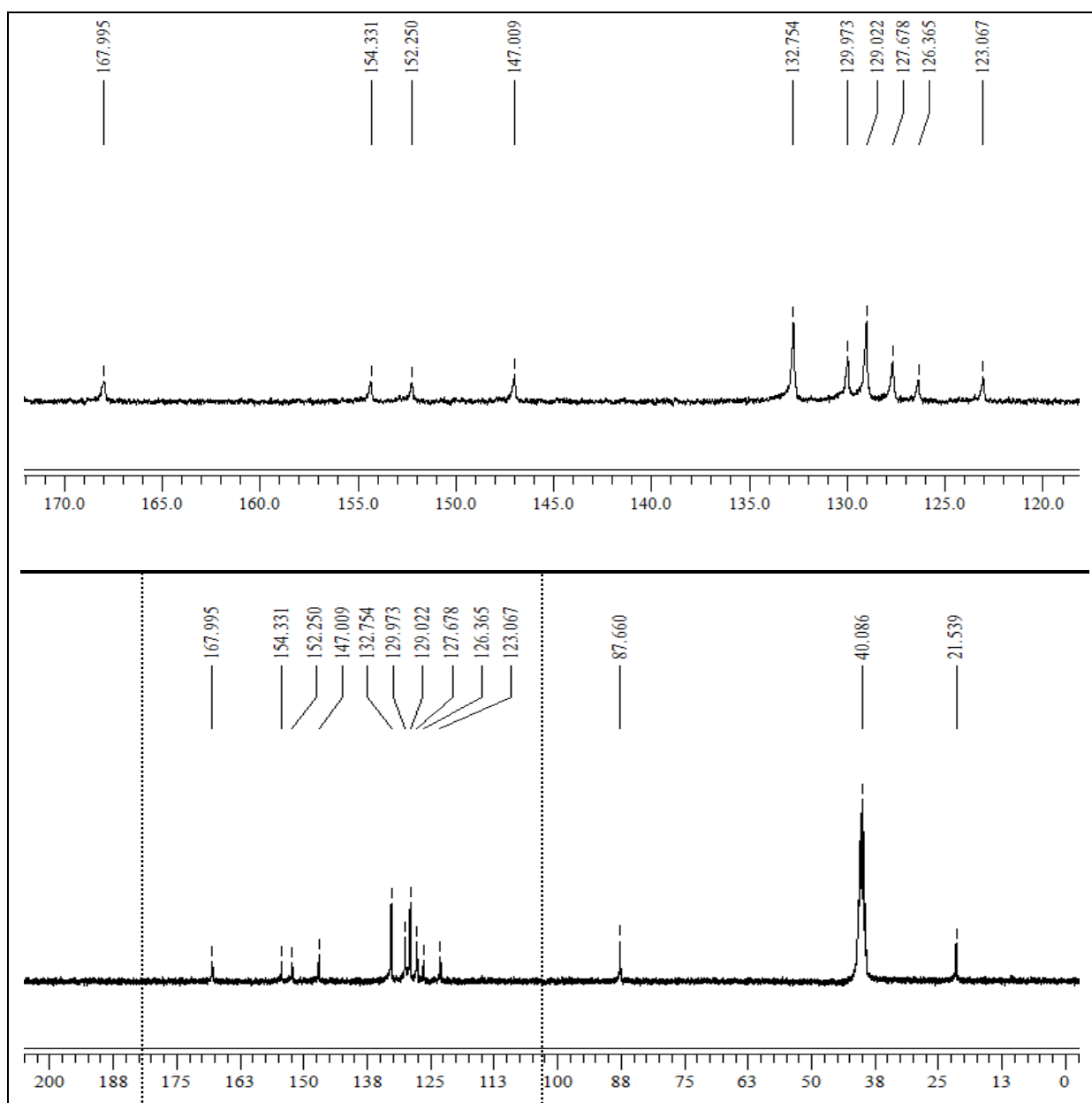
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 168,0 (C20), 154,2 (C5), 152,2 (C6), 147,0
 (C9), 137,4 (C17), 130,0 (C14), 129,8
 (C15,C19), 128,9 (C16,C18), 127,7 (C8),
 122,7 (C7), 87,6 (C2), 21,4 (C22)



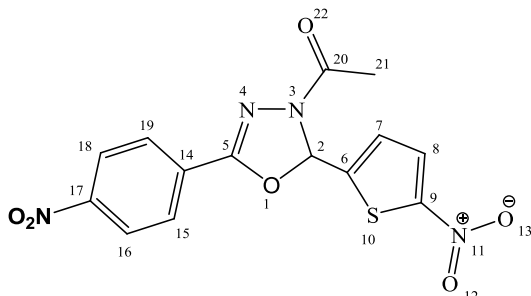
Espectros de RMN ^{13}C de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-bromo]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



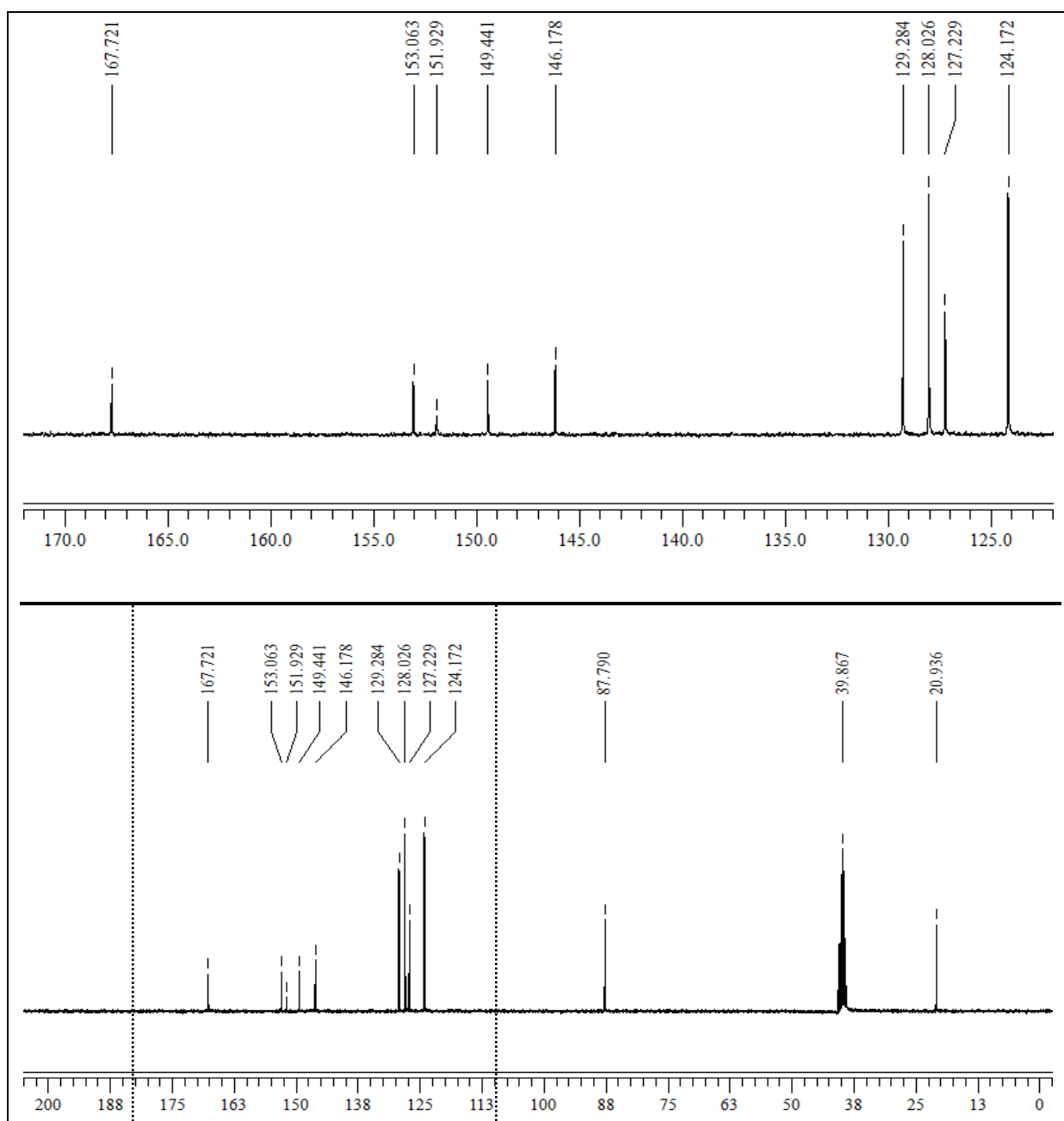
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 167,9 (C20), 154,3 (C5), 152,2 (C6),
 147,0 (C9), 132,8 (C16, C18), 130,0
 (C14), 129,0 (C15, C19), 127,7 (C8),
 126,3 (C7), 123,0 (C17), 87,7 (C2), 21,5
 (C22).



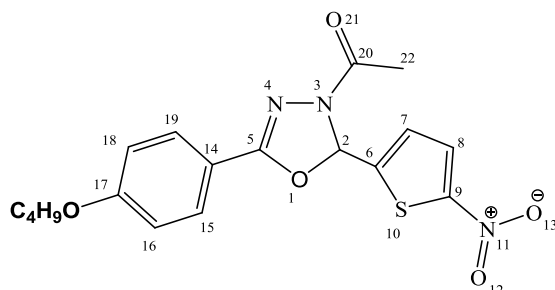
Espectros de RMN ^{13}C de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-nitro]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



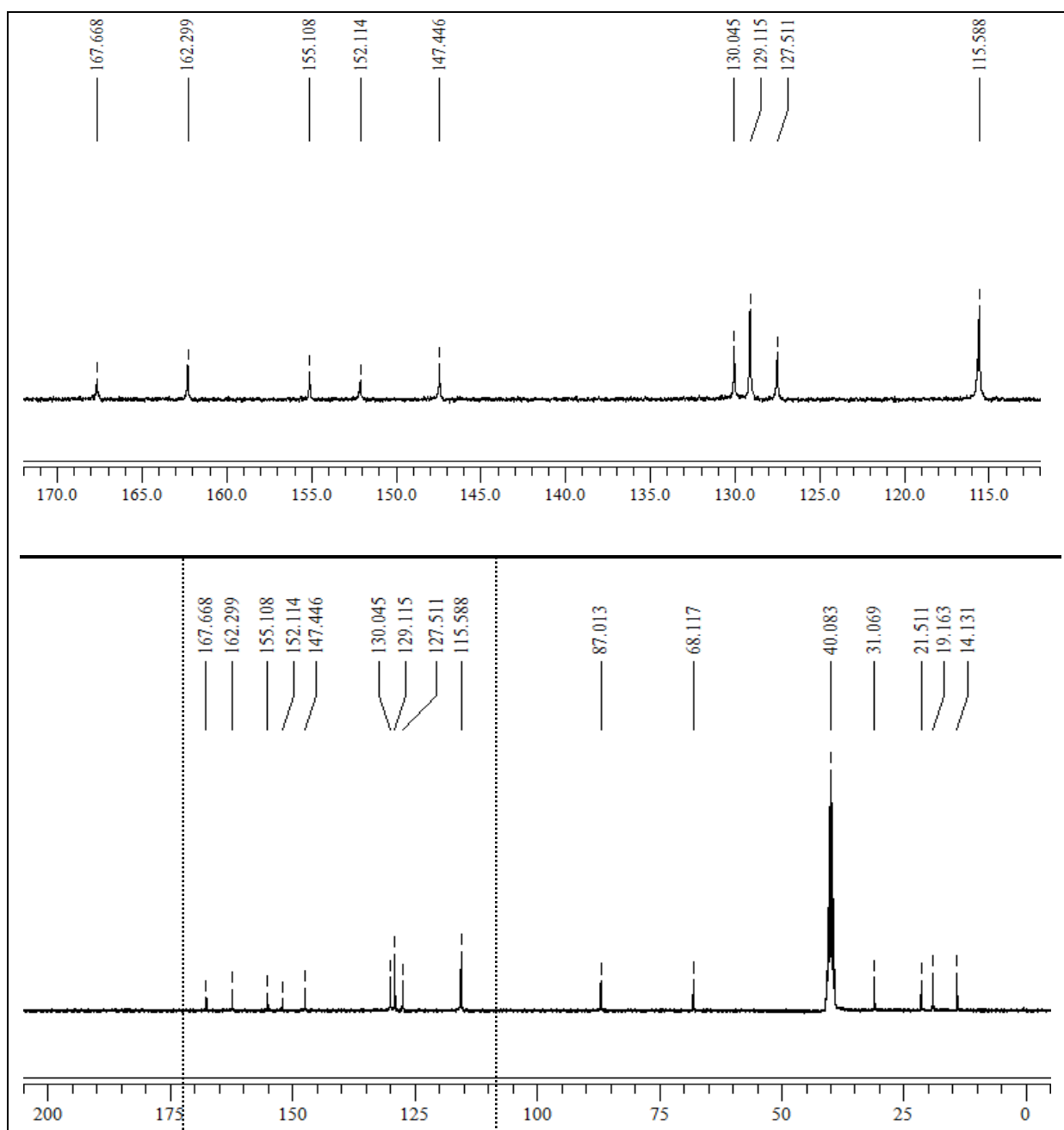
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 167,7 (C20), 153,0 (C5), 152,2 (C6), 149,4 (C9), 146,2 (C17), 129,3 (C14), 128,0 (C8), 127,2 (C7, C15, C19), 124,1 (C16, C18), 87,8 (C2), 21,0 (C22).



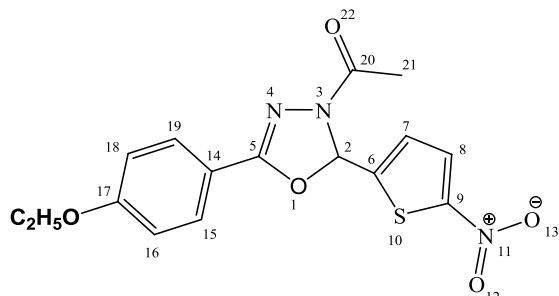
Espectros de RMN ^{13}C de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-butoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



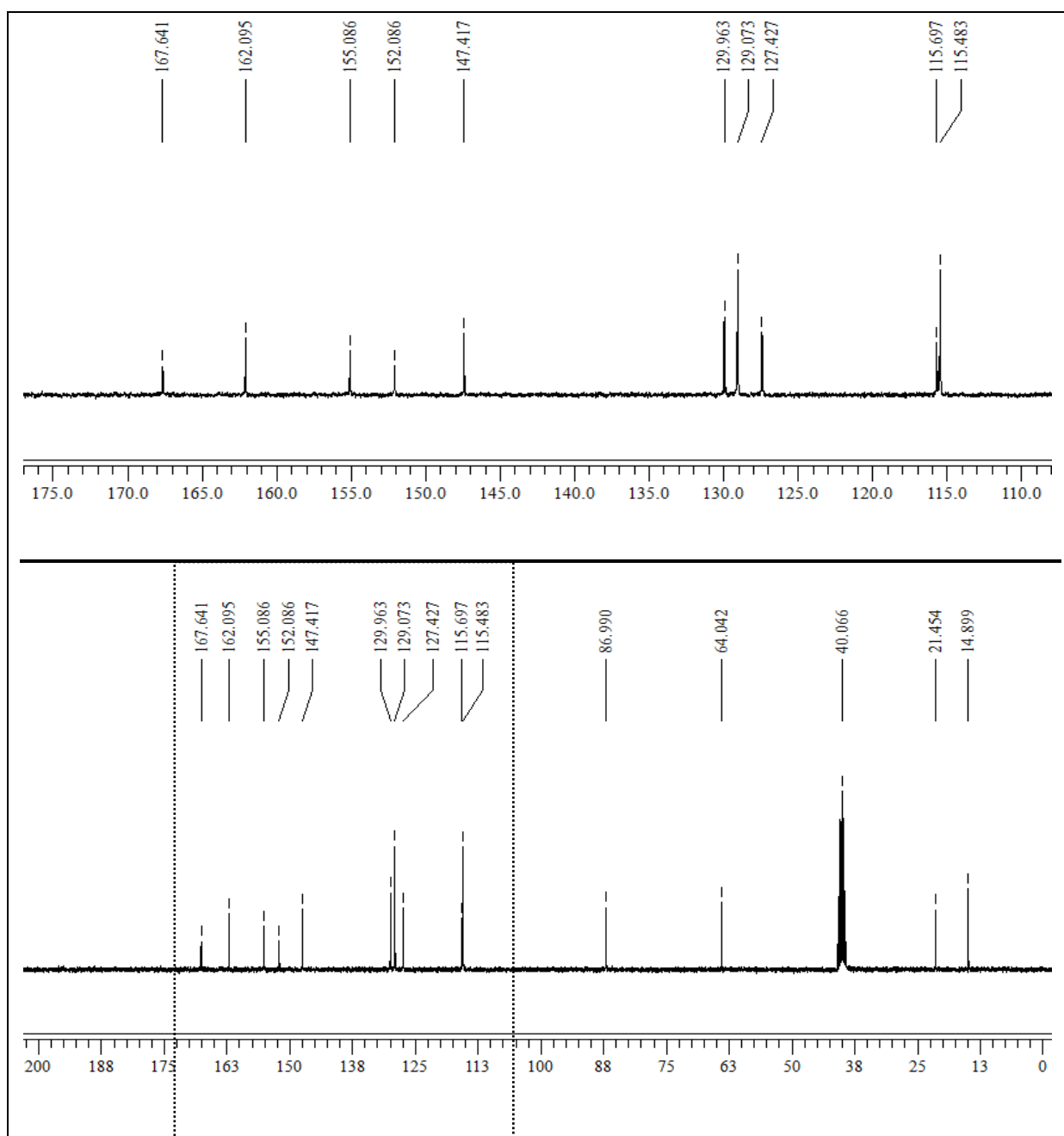
RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 167,7 (C20), 162,3 (C17), 155,1 (C5), 152,1 (C6), 147,4 (C9), 130,0 (C8), 129,1 (C7, C15, C19), 127,5 (C14), 115,6 (C16,C18), 87,0 (C2), 68,1(OCH $_2$), 31,1 (CH $_2$), 21,5 (C22), 19,2 (CH $_2$), 14,1 (CH $_3$).



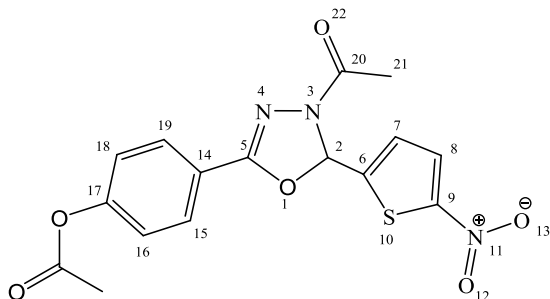
Espectros de RMN ^{13}C de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-etoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: DMSO- d_6 - padrão de referência interna: TMS



RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 167,6 (C20), 162,1 (C17), 155,1 (C5), 152,1 (C6), 147,4 (C9), 130,0 (C8), 129,1 (C7), 127,4 (C15,C19), 115,7 (C14), 115,5 (C16,C18), 87,0 (C2), 64,4 (OCH $_2$), 21,5 (C22), 14,9 (CH $_3$).



Espectros de RMN ^{13}C de [5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-acetoxi]-2,3-diidro-1,3,4-oxadiazol - solvente: $\text{DMSO-}d_6$ - padrão de referência interna: TMS



RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 75 MHz): δ (ppm):
 168,8 (C20), 167,4 (C=O), 154,0 (C5),
 153,3 (C6), 151,7 (C17), 146,6 (C9), 129,4
 (C14), 128,2 (C15,C19), 127,1 (C8), 122,8
 (C16,C18), 120,8 (C7), 87,0 (C2), 21,0
 (C22), 20,8 (CH_3).

