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

**Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR de
derivados benzofuroxânicos com atividade frente
Staphylococcus aureus e *Trypanosoma cruzi***

Salomão Dória Jorge

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica

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

J82p	<p>Jorge, Salomão Dória Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR de derivados benzofuroxânicos com atividade frente <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> / Salomão Dória Jorge. -- São Paulo, 2011. 328p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Tavares, Leoberto Costa</p> <p>1. Fármaco : Planejamento : Química farmacêutica 2. Relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica (QSAR) : Química farmacêutica 3. Síntese : Química orgânica 4. Ensaios biológicos : Farmacologia I. T. II. Tavares, Leoberto Costa, orientador.</p> <p>615.19 CDD</p>
------	---

Salomão Dória Jorge

**Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR de
derivados benzofuroxânicos com atividade frente
Staphylococcus aureus e *Trypanosoma cruzi***

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares
orientador/presidente

Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales
IQ/USP

Prof. Dr. Antonio Tavora de Albuquerque Silva
UNIFESP

Profa. Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto
Instituto Butantan

Prof. Dr. Roberto Parise Filho
FCF/USP

São Paulo, 8 de dezembro de 2011.

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

*.. à minha noiva Simone, exemplo de pessoa maravilhosa, sempre ao meu lado com suas palavras carinhosas, apoio constante e amor incondicional, essenciais para que eu sempre seguisse adiante.
Amo você Si.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Hélio e Fátima, ao meu irmão Trajano, minha noiva Simone, a minha avó Aline, meus sogros Roberto e Shirley por sempre me apoiarem e acreditarem em mim.

Ao Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares pela oportunidade que me foi dada, sua valiosa orientação, pelo exemplo de liderança, e principalmente, pela amizade e a confiança construídas ao longo dos anos.

À Profa. Dra. Marina Ishii pela amizade, preciosos ensinamentos, colaboração na implementação dos ensaios biológicos desenvolvidos neste trabalho, pela convivência e incansáveis horas de apoio e motivação.

À mestranda Fanny Palace-Berl pelas inúmeras discussões valiosas, pela dedicação e auxílio prestados em várias etapas deste estudo.

À Profa. Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto pelo incentivo e ensinamentos na área de modelagem molecular e, por toda orientação e colaboração prestadas com muita solicitude e simpatia ao longo deste trabalho.

Aos colegas do LPDF: Alex de Oliveira, Rodrigo Zorzi, Leandro Bortolozzo e João Sussumu; do LAPEN: Gustavo Henrique Goulart Trossini, Bárbara Vaz da Silva e Ricardo Serafim; do CENAPAD-SP: Euzébio Guimarães e JP Martins; e Cléber André Cechinel da Faculdade de Tecnologia e Ciências-Salvador-BA, pelas constantes trocas de informações, horas de conversas, convivência e companheirismo.

Aos “veteranos” de LPDF, Fávero Reisdorfer, Ieda Sonehara, Andrea Masunari, Sibila Grallert e a querida técnica Maria das Graças pela amizade, ensinamentos, discussões, sugestões e convivência.

Aos amigos Rodrigo Lima e Leandro Araujo pelos momentos de convivência e descontração, e principalmente, pelos seus valiosos conselhos, pelas palavras de apoio e de motivação.

À Dra. Maria Inês de Almeida Gonçalves pela realização e discussão dos espectros de RMN.

À Profa. Dra. Elsa Masae Mamisuka do Departamento de Análises Clínicas-FCF/USP pela simpatia e gentileza em ceder as cepas resistentes de *S.aureus* utilizadas neste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Júlia Manso Alves, do Departamento de Bioquímica-IQ/USP, pelo suporte fundamental para o estabelecimento dos ensaios biológicos frente a *T.cruzi*, e técnicas Marinei e Célia pelo auxílio e ensinamentos acerca da manutenção das culturas de *T.cruzi*.

À Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira, do Departamento de Farmácia-FCF/USP pelo acesso à licença acadêmica do programa MOLSIM3.2. (*The Chem21 Group*) instalado no LAPEN.

À Profa. Dra. Regina Aparecida Messias Guilherme do Departamento de Educação da Universidade Estadual de Ponta Grossa pela dedicada correção ortográfica e gramatical realizada neste estudo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela oportunidade de realização deste trabalho;

À Miriam e Elza, da Secretária do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica-FCF/USP e ao Jorge e Elaine da Secretaria de Pós-Graduação da FCF/USP pela atenção e solicitude.

À CAPES, FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro e novamente ao CNPq, pela bolsa de estudos sem a qual não teria sido possível a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus, que me guiou e esteve ao meu lado em mais esta jornada de minha vida, e principalmente, por colocar estas pessoas maravilhosas em meu caminho.

RESUMO

A modificação molecular de fármacos do arsenal terapêutico é estratégia promissora no planejamento e desenvolvimento de novas entidades químicas que possam apresentar características pertinentes deste fármaco, e suprimir suas características indesejáveis. Desta forma, na busca por novos compostos com atividade antimicrobiana, uma série de vinte [*N'*-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazidas substituídas, análogas funcionais da nifuroxazida (Passifuril®), foram sintetizadas e sua atividade biológica foi testada frente a cepas padrão e multirresistentes (MRSA e VISA) de *Staphylococcus aureus*, e frente a formas epimatigotas de *Trypanosoma cruzi*, agente causal da Doença de Chagas. A escolha dos grupos substituintes foi baseada em suas propriedades físico-químicas, tais como efeito eletrônico e hidrofobicidade, empregando o Diagrama de Craig. Os compostos foram obtidos por rota sintética descrita em literatura, assim como por rotas alternativas a fim de otimizar a metodologia tradicional e melhorar o rendimento dos produtos finais. Todos os compostos foram identificados e apresentam estrutura química inédita. A atividade dos vinte compostos frente *S. aureus* foi avaliada pelo método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM); destes, dezesseis apresentaram os mesmos intervalos de CIM frente as cepas padrão e multirresistentes. O composto dissustituído 3-CF₃,4-NO₂ (7t), apresentou a maior atividade com valores de CIM entre 12,7 – 11,4 µg/mL. A avaliação da atividade anti-*T. cruzi* também foi investigada, e na fase log de crescimento parasitário os compostos substituídos 4-H (7a), 4-CF₃ (7n), 3,4-Cl₂ (7s), 3-CF₃,4-NO₂ (7t) demonstraram os melhores resultados. O benznidazol, único fármaco utilizado no tratamento da Doença de Chagas, foi utilizado como referência nas mesmas concentrações. Os compostos que apresentaram melhores atividades nos ensaios realizados na fase estacionária de crescimento foram os compostos substituídos 4-I (7q) e 4-Br (7o) com valores de %IC₅₀ de 6,11 µM e 7,38 µM, respectivamente. A influência das propriedades físico-químicas dos grupos substituintes em ambas as atividades foi observada e, a fim de avaliar quantitativamente suas contribuições para a bioatividade, estudos de QSAR-2D e QSAR-3D foram desenvolvidos, auxiliando assim na predição de novas estruturas com propriedades farmacológicas otimizadas, uma vez que os resultados obtidos indicam o forte potencial destes compostos na identificação de novos candidatos a fármaco antimicrobiano.

ABSTRACT

Molecular modification of drugs from the therapeutic arsenal is a promising strategy for the design and development of new chemical entities that can demonstrate the relevant properties of this drug, and suppressing its undesirable properties. For the research of new leads with potential antimicrobial activity, a new series of twenty substituted [*N'*-(benzofuroxan-5-yl)methylene]benzohydrazides, nifuroxazide's (Passifuril®) functional analogs, was synthesized and tested against standard and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA and VISA) strains and against epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' Disease. The selection of the substituent groups was based on their physicochemical properties, such as hydrophobicity and electronic effects, employing Craig's diagram. The designed compounds were obtained by synthetic route described in the literature, as well as by an alternative route, in order to optimize the traditional methodology and also to improve the final compounds yields. All compounds were identified as unpublished chemical structures. Bacterial activity of the twenty compounds against *S. aureus* was performed by minimal inhibitory concentration method (MIC), and sixteen of them exhibited similar bacteriostatic activity against standard and multidrug-resistant strains. The most active compound was the 3-CF₃,4-NO₂ disubstituted derivative (*7t*), which presented a MIC value from 12.7 to 11.4 µg/mL. Anti-*T. cruzi* activity was also investigated. The substituted compounds 4-H (*7a*), 4-CF₃ (*7n*), 3,4-Cl₂ (*7s*), 3-CF₃,4-NO₂ (*7t*) showed better results at logarithmic growth phase. Benznidazole, that is the only drug available to threat Chagas' disease, was used as a reference drug at the same concentrations of the compounds studied. The most effective substituted compounds were the 4-I (*7q*) and 4-Br (*7o*) substituted derivatives having %IC₅₀ values of 6.11 µM and 7.38 µM, respectively, at stationary growth phase. The influence of the substituent's physicochemical properties on *in vitro* activities was observed, and, in order to establish quantitatively their contributions to bioactivity, 2D-QSAR and 3D-QSAR studies were developed, assisting in the prediction of new leads with improved pharmacological properties, since the results showed benzofuroxan derivatives as potential leads for identifying new drug candidates.

*“Para se ter sucesso, é necessário amar de
verdade o que se faz.
Caso contrário, levando em conta apenas o
lado racional, você simplesmente desiste.
É o que acontece com a maioria das pessoas.”*

Steve Jobs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Estágios necessários para introduzir um fármaco no mercado	35
Figura 1.2	Novas moléculas aprovadas pelo FDA no período de 1996-2009	37
Figura 1.3	Razões de falhas no processo de desenvolvimento de novos fármacos	38
Figura 1.4	Exemplo de análogos verdadeiros	39
Figura 1.5	Exemplo de análogos estruturais	40
Figura 1.6	Exemplo de análogos funcionais	40
Figura 1.7	Reação de ionização de ácidos benzóicos <i>para</i> ou <i>meta</i> substituídos	41
Figura 1.8	Receptor biológico hipotético e algumas interações FR	42
Figura 1.9	Estudo sistemático para identificação de candidatos a fármacos por aplicação de estudos de QSAR	51
Figura 3.1	Planejamento da série de compostos	65
Figura 3.2	Via biorredutiva de nitrocompostos	67
Figura 3.3	Faixa de potencial de redução para diferentes classes de nitrocompostos	68
Figura 3.4	Estrutura química da tirapazamina	70
Figura 3.5	Compostos nitrofurânicos utilizados atualmente na farmacoterapia humana	71
Figura 3.6	Diagrama de Craig com os substituintes planejados para compor a série de derivados benzofuroxânicos	72
Figura 4.1	(A) Esquema de síntese do composto benzofuroxano. (B) estruturas sugeridas para o composto benzofuroxano	79
Figura 4.2	Reestruturação molecular de benzofuroxanos	80
Figura 4.3	Comparação da estrutura molecular do benzodifuroxano 26 com a estrutura da trinitroglicerina 27	81
Figura 4.4	Estrutura química do diclofenaco sódico 28 e do diclofenaco híbrido com benzofurano 29	83
Figura 4.5	Estrutura química dos compostos 30, 31 e nifurtimox 20	83
Figura 4.6	Estruturas química dos compostos 32 – 40 e benznidazol 41	84
Figura 4.7	Síntese dos derivados benzofuroxanos	86

Figura 4.8	Caminhos sintéticos utilizados na obtenção de benzidrazidas	87
Figura 4.9	Síntese das benzidrazidas em duas etapas sintéticas	88
Figura 4.10	Síntese das benzidrazidas em uma etapa sintética	89
Figura 4.11	Caminhos sintéticos utilizados na síntese do aldeído 5-formilbenzofuroxano	90
Figura 4.12	Síntese do aldeído 5-formilbenzofuroxano em duas etapas sintéticas	91
Figura 4.13	Síntese do aldeído 5-formilbenzofuroxano em uma etapa sintética ..	92
Figura 4.14	Reação de obtenção dos derivados benzofuroxânicos	92
Figura 4.15	Mecanismo de esterificação de Fischer	94
Figura 4.16	Mecanismo de reação de amonólise de ésteres	97
Figura 4.17	Espectro de RMN ¹ H dos produtos obtidos nas duas condições utilizadas na amonólise do éster 4-nitrobenzoato de metila	98
Figura 4.18	Mecanismo de reação de substituição nucleofílica aromática	103
Figura 4.19	Mecanismo de ciclocondensação da <i>orto</i> -nitrofenil azida	104
Figura 4.20	Mecanismo de catálise por transferência de fase	106
Figura 4.21	Mecanismo de adição nucleofílica	107
Figura 4.22	Espectro de RMN ¹ H do composto 7a registrado em diferentes temperaturas	116
Figura 5.1	Estruturas da parede celular que envolvem a membrana citoplasmática de bactérias gram-positivas	130
Figura 5.2	Esquema de preparo das soluções-mãe dos compostos	137
Figura 5.3	Esquema de preparo de inóculo da cepa ATCC25923	139
Figura 5.4	Esquema de preparo de inóculo das cepas 3SP/R33 e VISA3	140
Figura 5.5	Procedimento geral adotado na determinação da CIM	141
Figura 5.6	Procedimento geral adotado para diluição dos compostos na fase II	143
Figura 5.7	Procedimento para confecção das placas de Petri	144
Figura 5.8	Visualização do ensaio após 18 horas de incubação à 35°C	146
Figura 5.9	Visualização da microplaca após o período de incubação	147
Figura 6.1	Fundos de investimentos em P,D&I para doenças negligenciadas	162
Figura 6.2	Investimentos em P,D&I para doenças negligenciadas	163
Figura 6.3	Países endêmicos e estimativa do número de pessoas infectadas com <i>Trypanosoma cruzi</i> em países não – endêmicos	166

Figura 6.4	Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	167
Figura 6.5	Estrutura química dos fármacos atualmente empregados no tratamento da Doença de Chagas	169
Figura 6.6	Esquema de preparo das amostras para o preparo da curva de calibração	171
Figura 6.7	Esquema de preparo das soluções-mãe dos compostos para ensaio na fase log	173
Figura 6.8	Esquema de preparo do inóculo na fase log	174
Figura 6.9	Procedimento geral adotado para realização do ensaio	175
Figura 6.10	Esquema de preparo das soluções-mãe dos compostos para ensaio na fase estacionária	176
Figura 6.11	Esquema de preparo das soluções-mãe dos compostos para obtenção de concentrações intermediárias	177
Figura 6.12	Concentração de parasitas durante as 96 horas após a adição de 10 µg/mL dos compostos 7a – 7t , e benznidazol bnz	190
Figura 6.13	Concentração de parasitas durante as 96 horas após a adição de 20 µg/mL dos compostos 7a – 7t , e benznidazol bnz	192
Figura 6.14	Concentração de parasitas durante as 96 horas após a adição de 50 µg/mL dos compostos 7a – 7t , e benznidazol bnz	193
Figura 7.1	Perfil dos modelos linear, parabólico e bilinear	217
Figura 7.2	Fluxograma de trabalho	230
Figura 7.3	Gráfico de dispersão de descritor hipotético X em função da atividade biológica Y	234
Figura 7.4	Estruturas químicas da nifuroxazida, benzofuroxano e composto 7d	236
Figura 7.5	Modelos moleculares 3D da nifuroxazida (dados cristalografados) (A) e do composto 7d (B)	237
Figura 7.6	Mapas de potencial eletrostático dos compostos 7a, 7c e 7q utilizando GaussView3.0	239
Figura 7.7	Mapas de distribuição de orbitais moleculares de HOMO (A) e LUMO (B) calculados com o método HF/3-21G* para os compostos 7a, 7c e 7q , respectivamente, utilizando o programa GaussView 3.0 .	242

Figura 7.8	Mapas de potencial lipofílico dos compostos 7c e 7q , respectivamente, utilizando o programa <i>Sybyl 8.0</i>	243
Figura 7.9	Gráfico de dispersão dos descritores retirados da análise de QSAR-2D	245
Figura 7.10	Valores obtidos no processo de validação cruzada LNO	250
Figura 7.11	Parâmetros estatísticos <i>versus</i> número de componentes principais ou variáveis latentes do modelo	253
Figura 7.12	Valores obtidos no processo de validação cruzada LNO	253
Figura 7.13	(A) Gráfico de pesos e (B) de escores de PC1 versus PC2 para o modelo obtido com 3PCs	255
Figura 7.14	Gráfico de coeficientes do modelo PLS para os descritores que são diretamente (valores positivos) ou inversamente (valores negativos) correlacionados com a atividade anti- <i>T. cruzi</i> dos compostos	256
Figura 7.14	Representação da contribuição dos descritores na atividade anti- <i>T. cruzi</i> dos compostos 7q (A) e 7c (B) (<i>à direita</i>). MIFs dos respectivos compostos calculados no campo GRID com sonda OH2 (<i>à esquerda</i>)	258

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Dados experimentais obtidos na obtenção dos benzoatos de metila .	96
Tabela 4.2	Dados experimentais obtidos na obtenção das benzidrazidas	100
Tabela 4.3	Dados experimentais obtidos na obtenção das benzidrazidas	102
Tabela 4.4	Dados experimentais obtidos na síntese de derivados benzofuroxânicos	108
Tabela 4.5	Rendimentos parciais e totais obtidos na síntese dos derivados benzofuroxânicos	109
Tabela 4.6	Análise elementar dos derivados benzofuroxânicos	111
Tabela 4.7	Sinais de RMN ¹ H em DMSO- <i>d</i> ₆ (ppm) dos derivados benzofuroxânicos	112
Tabela 4.8	Sinais de RMN ¹³ C em DMSO- <i>d</i> ₆ (ppm) dos derivados benzofuroxânicos	114
Tabela 5.1	Concentração inibitória mínima, CIM, de derivados benzofuroxânicos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , cepa padrão ATCC25923	148
Tabela 5.2	Concentração inibitória mínima, CIM, de derivados benzofuroxânicos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , cepas multirresistentes 3SP/R33 e VISA3	149
Tabela 6.1	Concentrações utilizadas no preparo das soluções-mãe dos compostos	178
Tabela 6.2	Concentrações utilizadas no preparo das soluções-mãe dos compostos	180
Tabela 6.3	Número de parasitas/mL dos controles positivo e de solventes durante 96 horas	182
Tabela 6.4	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>N'</i> -(benzofuroxan-5-il)metileno benzidrazida(7a)	182
Tabela 6.5	Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-metil[<i>N'</i> -(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7b)	182

Tabela 6.6	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-amino[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7c)</i>	183
Tabela 6.7	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-hidróxi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7d)</i>	183
Tabela 6.8	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-fluoro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7e)</i>	183
Tabela 6.9	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-ciano[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7f)</i>	184
Tabela 6.10	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-etil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7g)</i>	184
Tabela 6.11	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-metóxi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7h)</i>	184
Tabela 6.12	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-cloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7i)</i>	185
Tabela 6.13	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-acetil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7j)</i>	185
Tabela 6.14	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-dimetilamino[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7k)</i>	185
Tabela 6.15	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-etóxi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7l)</i>	186
Tabela 6.16	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-nitro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7m)</i>	186
Tabela 6.17	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-trifluorometil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7n)</i>	186
Tabela 6.18	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-bromo[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7o)</i>	187
Tabela 6.19	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-sulfamoil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7p)</i>	187
Tabela 6.20	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>4-iodo[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7q)</i>	187
Tabela 6.21	Número de parasitas/mL após exposição ao composto <i>2,4-dicloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7r)</i>	188

Tabela 6.22	Número de parasitas/mL após exposição ao composto 3,4-dicloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7s)	188
Tabela 6.23	Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-nitro- 3-(trifluorometil)[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (7t) .	188
Tabela 6.24	Número de parasitas/mL após exposição ao composto de referência benznidazol, BNZ	189
Tabela 6.25	Curva de dose-resposta do composto N'-(benzofuroxan-5-il)metileno benzidrazida (7a)	194
Tabela 6.26	Curva de dose-resposta do composto 4-metil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7b)	195
Tabela 6.27	Curva de dose-resposta do composto 4-amino[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7c)	195
Tabela 6.28	Resultados de %IC obtidos após a exposição ao composto 4-hidróxi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7d)	196
Tabela 6.29	Curva de dose-resposta do composto 4-fluoro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7e)	196
Tabela 6.30	Curva de dose-resposta do composto 4-ciano[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7f)	196
Tabela 6.31	Curva de dose-resposta do composto 4-etil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7g)	197
Tabela 6.32	Curva de dose-resposta do composto 4-metóxi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7h)	197
Tabela 6.33	Curva de dose-resposta do composto 4-cloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7i)	198
Tabela 6.34	Curva de dose-resposta do composto 4-acetil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7j)	198
Tabela 6.35	Resultados de %IC obtidos após a exposição ao composto 4-dimetilamino[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7k)	199
Tabela 6.36	Curva de dose-resposta do composto 4-etóxi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7l)	199
Tabela 6.37	Curva de dose-resposta do composto 4-nitro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7m)	200

Tabela 6.38	Curva de dose-resposta do composto 4-trifluoro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7n)	200
Tabela 6.39	Curva de dose-resposta do composto 4-bromo[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7o)	201
Tabela 6.40	Curva de dose-resposta do composto 4-sulfamoil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7p)	201
Tabela 6.41	Curva de dose-resposta do composto 4-iodo[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7q)	202
Tabela 6.42	Curva de dose-resposta do composto 2,4-dicloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7r)	202
Tabela 6.43	Curva de dose-resposta do composto 3,4-dicloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7s)	203
Tabela 6.44	Curva de dose-resposta do composto 4-nitro- 3-(trifluorometil)-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7s).	203
Tabela 6.45	Curva de dose-resposta do benznidazol	204
Tabela 6.46	%IC ₅₀ dos compostos 7a – 7t e benznidazol	205
Tabela 7.1	Descritores calculados e obtidos de literatura para os compostos investigados	233
Tabela 7.2	Valores das contribuições de energia resultantes da simulação de DM de 1 ns a 310K para o confômero selecionado	238
Tabela 7.3	Valores de cargas ChelpG (eV) dos compostos 7a , 7c e 7q	240
Tabela 7.4	Valores de potência referente a atividade frente a <i>S. aureus</i> e a <i>T. cruzi</i> de R_1, R_2, R_3 -[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazidas ...	244
Tabela 7.5	Valores experimentais (Y _{exp}) e calculados (Y _{calc}) de AB _{TC} e valores de resíduo (Y _{exp} – Y _{calc}) obtidos a partir da equação 7.16 e também o gráfico de dispersão Y _{exp} (Y _{obs}) versus Y _{calc}	249
Tabela 7.6	Índices estatísticos obtidos com o método PLS após a seleção de variáveis independentes	252
Tabela 7.7	Valores experimentais (Y _{exp}) e valores calculados (Y _{calc}) de AB _{TC} e os respectivos resíduos obtidos a partir do modelo com 3 PCs	254

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
4D	Quadridimensional
5D	Pentadimensional
6D	Hexadimensional
AB _{SA}	Atividade biológica em <i>Staphylococcus aureus</i> (log1/C)
AB _{TC}	Atividade biológica em <i>Trypanosoma cruzi</i> (log1/C)
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
AM1	Modelo Austim 1 (<i>Austim Model 1</i>)
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteróides
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASA _h	Superfície acessível ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos
ASA-	Superfície acessível ao solvente de todos os átomos com carga parcial negativa
ATCC	Coleção de microrganismos Norte americana (<i>American Type Culture Collection</i>)
BZN	benznidazol
CA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina adquirida na comunidade (<i>Community-Acquired – Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
CCD	Cromatografia em camada delgada
ChelpG	Cargas atômicas ajustados pelo potencial eletrostático (<i>Charges from Electrostatic Potentials using a Grid based method</i>)
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CoMFA	Análise comparativa dos campos moleculares (<i>Comparative Molecular Field Analysis</i>)
CoMSIA	Análise comparativa dos índices de similaridades moleculares (<i>Comparative Molecular Similarity Field Analysis</i>)
COX	Ciclooxigenase
DALY	Anos de vida ajustados à incapacidade (<i>Disability-Adjusted Life Years</i>)
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EHNA	<i>Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-adenina</i>
<i>E</i> _{HOMO}	Energia do orbital molecular ocupado de maior energia (<i>Highest Occupied Molecular Orbital Energy</i>)
<i>E</i> _{LUMO}	Energia do orbital molecular desocupado de menor energia (<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital Energy</i>)
<i>E</i> _s	Constante de Taft
F	Teste de significância estatística de Fischer
fs	Fentosegundo

FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FFD	Planejamento fatorial fracionado (<i>Factorial Fractional Design</i>)
FR	Fármaco-receptor
G-FINDER	Fundo Global de Inovação para Doenças Negligenciadas (<i>Global Funding of Innovation for Neglected Diseases</i>)
HA-MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina associada a infecções hospitalares (<i>Hospital-Acquired - Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
HETCOR	Correlação espectroscópica heteronuclear (<i>HETeronuclear CORrelation spectroscopy</i>)
HF	Método <i>ab initio</i> Hartree-Fock
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% de células
IND	Investigação de novo fármaco (<i>Investigational New Drug</i>)
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>K_a</i>	Constante de ionização ácida
<i>K_i</i>	Constantes de inibição
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LFER	Relações lineares de energia livre (<i>Linear Free Energy Relationships</i>)
LIT	Infusão de fígado e triptose (<i>Liver Infusion Tryptose</i>)
logP	Coefficiente de partição
LNO	Método deixe vários de fora (<i>Leave-N-Out</i>)
LOO	Método deixe um de fora (<i>Leave-One-Out</i>)
MEP	Mapas de potencial eletrostático molecular (<i>Maps of Electrostatic Potential</i>)
MIF	Campo de interação molecular (<i>Molecular Interaction Fields</i>)
MLP	Mapas de potencial lipofílico molecular (<i>Maps of Lipophilicity Potential</i>)
MM	Massa molar
MM2	Campo de força empírico
MM+	Campo de força derivado do MM2
MLR	Regressão linear múltipla (<i>Multiple Linear Regression</i>)
MR	Refratividade molar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo - forma reduzida
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato - forma reduzida
NCE	Nova entidade química (<i>New Chemical Entity</i>)
NDA	Requisição de um novo fármaco (<i>New Drug Application</i>)
NFX	nifurtimox
P,D&I	Pesquisa, desenvolvimento e inovação
PAC	Perfil de amostragem conformacional
PBP	Proteína ligadora de penicilina (<i>Penicilin Binding Protein</i>)
PCA	Análise dos componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i>)

PCA'	Agar para contagem de placas (<i>Plate Count Agar</i>)
PC	Componente principal (<i>Principal Component</i>)
PCR	Regressão em componentes principais (<i>Principal Component Regression</i>)
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais (<i>Partial Least Squares</i>)
Q ²	Coeficiente de validação cruzada
QSAR	Relações quantitativas entre estrutura e atividade (<i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i>)
QSPR	Relações quantitativas entre estrutura e propriedade (<i>Quantitative Structure-Property Relationships</i>)
QSSR	Relações quantitativas entre estrutura e seletividade (<i>Quantitative Structure-Selectivity Relationships</i>)
QSTR	Relações quantitativas entre estrutura e toxicidade (<i>Quantitative Structure-Toxicity Relationships</i>)
r (R)	Coeficiente de correlação
R ²	Coeficiente de determinação múltipla
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio
RMSD	Raiz quadrada do desvio médio (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
RNA	Ácido ribonucléico
s	Desvio padrão
SDEP	Desvio padrão do erro de predição (<i>Standard Deviation of Errors of Prediction</i>)
TSB	Caldo trípico de soja (<i>Tryptic Soy Broth</i>)
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
V	Volts
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária a vancomicina (<i>Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus</i>)
VL	Variável latente
V _m	Volume molar
VolSurf	Volume e superfície (<i>Volume and Surface</i>)
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina (<i>Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus</i>)
V _w	Volume de van der Waals
δ ⁻	Cargas parciais negativas
δ ⁺	Cargas parciais positivas
ΔH ₁	Energia de formação
ρ	Constante de reação
σ	Constante de Hammet
π	Constante de Hansch
μ	Momento de dipolo
ℑ	Constante de campo de Swain e Lupton
ℜ	Constante de ressonância de Swain e Lupton
δ	Deslocamento químico em espectros de RMN
ν	Frequência de absorção na região do infravermelho

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	29
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	33
1.1 Desenvolvimento de Fármacos	35
1.2 Estudos de QSAR	41
1.2.1 Origem e Evolução	42
1.2.2 Interação Fármaco-Receptor	48
1.2.3 Planejamento de Série de Compostos para estudos de QSAR	51
Referências Bibliográficas	54
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS	61
CAPÍTULO 3 – PLANEJAMENTO DA SÉRIE DE COMPOSTOS	63
3.1 Introdução	65
3.2 Composto-Protótipo	65
3.3 Definição da Variação Estrutural	69
3.3.1 Grupo Farmacofórico	69
3.3.2 Grupo Azometínico	70
3.3.3 Variações do Anel Benzênico	71
3.4 Escolha dos Grupos Substituintes	71
Referências Bibliográficas	73
CAPÍTULO 4 – SÍNTESE DOS COMPOSTOS	77
4.1 Introdução	79
4.2 Objetivos	85
4.3 Materiais e Métodos	85
4.3.1 Obtenção das benzidrazidas – 1ª etapa	87
4.3.2 Obtenção do 5-formilbenzofuroxano – 2ª etapa	90
4.3.3 Obtenção dos derivados benzofuroxânicos – 3ª etapa	92
4.3.4 Análises Físico-Químicas	92

4.4 Resultados e Discussão	93
4.4.1 Obtenção das benzidrazidas – 1ª etapa	93
4.4.2 Obtenção do 5-formilbenzofuroxano – 2ª etapa	102
4.4.3 Obtenção dos derivados benzofuroxânicos – 3ª etapa	106
4.5 Conclusões	117
Referências Bibliográficas	118
 CAPÍTULO 5 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i>	125
5.1 Introdução	127
5.2 Objetivos	135
5.3 Materiais e Métodos	136
5.3.1 Preparo dos meios de cultura	136
5.3.2 Preparo das soluções-mãe de compostos a serem testados	136
5.3.3 Preparo do inóculo	138
5.3.4 Determinação da concentração inibitória mínima, CIM	140
5.3.5 Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC)	144
5.4 Resultados e Discussão	145
5.5 Conclusões	151
Referências Bibliográficas	152
 CAPÍTULO 6 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FRENTE A <i>Trypanosoma cruzi</i>	159
6.1 Introdução	161
6.2 Objetivos	170
6.3 Materiais e Métodos	170
6.3.1 Preparo da curva de calibração	170
6.3.2 Ensaio na fase log	173
6.3.3 Ensaio na fase estacionária	176
6.4 Resultados e Discussão	179
6.4.1 Preparo da curva de calibração	179
6.4.2 Ensaio na fase log	181
6.4.3 Ensaio na fase estacionária	194
6.5 Conclusões	206

Referências Bibliográficas	207
CAPÍTULO 7 – ESTUDOS DE QSAR	213
7.1 Introdução	215
7.2 Análise de Hansch – QSAR-2D	215
7.2.1 Descritores utilizados na análise de Hansch	218
7.2.2 Modelo matemático utilizado na análise de Hansch	220
7.3 Abordagem VolSurf – QSAR-3D	222
7.3.1 Descritores utilizados na abordagem VolSurf	224
7.3.2 Modelos matemáticos utilizados na abordagem VolSurf	227
7.4 Objetivos	229
7.5 Materiais e Métodos	230
7.5.1 Construção das moléculas e cálculo de propriedades moleculares	231
7.5.2 Estudos de QSAR-2D	233
7.5.3 Estudos de QSAR-3D	235
7.6 Resultados e Discussão	236
7.6.1 Construção das moléculas e cálculo de propriedades moleculares	236
7.6.2 Estudos de QSAR-2D	244
7.6.3 Estudos de QSAR-3D	251
7.7 Conclusões	259
Referências Bibliográficas	259
CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES	265
Anexo 1 – Espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C dos compostos sintetizados	269
Anexo 2 – Controle de turbidez para o preparo do inóculo	316
Anexo 3 – Planilhas utilizadas na execução dos ensaios	317
Anexo 4 – Valores dos parâmetros descritores calculados e obtidos da literatura para os compostos estudados	320
Apêndice 1 – Artigos científicos publicados	323

APRESENTAÇÃO

A resistência demonstrada por microrganismos, sejam estas bactérias, vírus, fungos ou parasitas é um fenômeno natural, e sempre foi observado e monitorado desde a introdução dos primeiros agentes antimicrobianos. Entretanto, diversos fatores contribuíram para acelerar a seleção de microrganismos multirresistentes, dentre os quais, cita-se a pressão seletiva aos antimicrobianos, decorrentes principalmente, do uso incorreto e irracional destes fármacos. Hoje em dia, relatos de microsurtos ou mesmo grandes epidemias têm ocorrido de maneira acentuada, o que é cada vez mais preocupante, uma vez que, as opções para o tratamento das infecções causadas por tais microrganismos estão se tornando obsoletas.

As opções terapêuticas também mostram-se deficitárias em relação as doenças negligenciadas, principalmente as doenças tropicais endêmicas, as quais, por falta de investimento, são tratadas com fármacos antigos e, geralmente, ineficazes, facilitando assim, o surgimento de resistência. Para estas doenças existe um descaso das grandes indústrias farmacêuticas em investir em pesquisa, desenvolvimento e inovação em novos fármacos, por afetar, em sua maioria, as populações de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Desta forma, o retorno financeiro não seria o suficiente para cobrir os investimentos e as metas dos grandes conglomerados farmacêuticos, pois tais fármacos seriam destinados à populações mais pobres. Outro fator, seria a proteção patentária, ou seja, a indústria visa os retornos enquanto a patente de um fármaco perdura até que outras indústrias possam explorar este fármaco, com isso, é mais viável desenvolver fármacos mais eficazes e menos tóxicos para doenças crônicas que atendam as populações mais abastadas do ponto de vista econômico, tais como fármacos para doenças cardiovasculares, câncer e doenças metabólicas.

Baseado nestes fatos, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos que possam ser utilizados no tratamento de doenças negligenciadas tornam-se o foco das Instituições de Ensino e Pesquisa dos países em desenvolvimento, entre eles o Brasil tem contribuído de maneira significativa, juntamente com outros países da própria América do Sul, da África e Ásia. Assim, inserido neste contexto, o presente trabalho foi elaborado a fim de desenvolver e identificar novas entidades químicas, com a

perspectiva de serem futuramente utilizados como candidato a fármaco ou como composto-protótipo, buscando contribuir com o tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes e hemoparasitoses negligenciadas. Para tanto, foram abordados aspectos teóricos e experimentais envolvidos no processo de planejamento e desenvolvimento de compostos-protótipos, que possam demonstrar atividade biológica interessante frente a *Staphylococcus aureus* e ao *Trypanosoma cruzi*, e para discorrer as etapas realizadas desde o planejamento até a identificação de novas moléculas, esta Tese de Doutorado foi segmentada em capítulos.

No **capítulo 1** é apresentado de maneira sucinta o complexo caminho envolvido no planejamento de fármacos, desde a identificação de novas moléculas até a sua introdução no mercado, incluindo o tempo e o orçamento envolvidos no processo. Neste mesmo capítulo, são introduzidos os conceitos de QSAR, estratégia de planejamento de fármacos selecionada neste trabalho, e abordados os modelos desenvolvidos para tal, assim como as principais contribuições de diferentes pesquisadores nesta área. Adicionalmente, são expostas as etapas envolvidas na identificação de um composto candidato a fármaco e/ou um composto protótipo-otimizado.

O **capítulo 2** descreve os objetivos gerais e específicos deste trabalho, englobando as etapas necessárias para identificar o composto-protótipo otimizado, abordadas no capítulo 1, enquanto que no **capítulo 3**, um embasamento teórico é descrito para detalhar as etapas envolvidas no planejamento da série de derivados benzofuroxânicos, justificando assim, as modificações estruturais feitas no composto protótipo selecionado neste estudo.

O **capítulo 4** apresenta aspectos químicos e aplicações biológicas de derivados benzofuroxânicos, com finalidade de demonstrar o grande interesse que estes compostos vem despertando em diferentes áreas. Neste capítulo descreve-se também a síntese dos compostos planejados, aplicando etapas sintéticas clássicas, alternativas e otimizadas, assim como a identificação estrutural de todos os compostos sintetizados.

O **capítulo 5** introduz o problema da resistência bacteriana no cenário atual e que é exemplificado por algumas espécies responsáveis por infecções graves, assim como os mecanismos que estes microrganismos se utilizam para adquirir resistência a diversos

antimicrobianos. Um enfoque mais aprofundado é dado a espécie *Staphylococcus aureus* e é apresentado alguns episódios a respeito da evolução dos mecanismos de resistência bacteriana desenvolvidos por este microrganismo. Em seguida são detalhados os ensaios e resultados obtidos da avaliação da atividade antibacteriana dos compostos sintetizados, utilizando como parâmetro a concentração inibitória mínima.

O **capítulo 6** apresenta as principais doenças negligenciadas, assim como os investimentos e principais mantenedores dos programas destinados a tais doenças. Na sequência, a Doença de Chagas torna-se o ponto principal, com informações a respeito da descoberta da doença, vias de transmissão, epidemiologia, morfologia do parasito, estágios do quadro clínico e opções de tratamento. Posteriormente, são detalhados os ensaios realizados para avaliar a atividade dos compostos sintetizados frente a formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, patógeno responsável pela Doença de Chagas, assim como os resultados obtidos destes ensaios.

No **capítulos 7** são apresentados os aspectos teóricos envolvidos em estudos de QSAR-2D e QSAR-3D, tais como descritores, métodos quimiométricos de regressão e critérios necessários para validação estatística das relações entre as propriedades físico-químicas e estruturais dos compostos planejados com as atividades investigadas frente a *S. aureus* e frente a *T. cruzi*. Por fim, o **capítulo 8** é destinado as conclusões obtidas do desenvolvimento deste estudo como um todo.

Assim, esta Tese de Doutorado, demonstra e executa etapas envolvidas na identificação de compostos-protótipo ou candidatos a fármaco, envolvendo o planejamento de uma série de compostos análogos, sua síntese, caracterização e determinação da atividade biológica, finalizando com a definição de novos compostos promissores, por aplicação do planejamento racional orientado por estudos de QSAR-2D/3D.

O desenvolvimento da metodologia sintética e de determinação da atividade biológica frente a *S. aureus* e a *T. cruzi*, bem como os resultados deste trabalho encontram-se na forma de artigos científicos já publicados em periódicos pertinentes à área de desenvolvimento de fármacos (listados no **Apêndice 1**) e outros encontram-se em fase de elaboração.

1

Introdução

1.1 Desenvolvimento de Fármacos

A descoberta de novos fármacos com estrutura química completamente nova é altamente dispendiosa, envolve vários anos de pesquisa e exige o esforço de equipes multidisciplinares. Para que um novo fármaco possa ser lançado no mercado é necessário que este passe por diversas etapas de pesquisas e testes até sua aprovação por órgãos governamentais. No Brasil, o responsável pela regulamentação e autorização é a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Ministério da Saúde) enquanto que nos Estados Unidos fica ao encargo da FDA (*Food and Drug Administration*) [1, 2]. O processo de regulamentação de um fármaco é complexo, rigoroso e demanda altos investimentos para as empresas da indústria farmacêutica. Estima-se que os investimentos envolvidos no desenvolvimento de um “*blockbuster drug*” (termo em inglês usado para designar os fármacos com vendas anuais superiores a US\$ 1 bilhão) podem estar próximos de US\$ 800 milhões [3], ou até mesmo acima de US\$ 1 bilhão [4]. Essas variações são encontradas nas despesas com os ensaios clínicos [4], que, além de influenciarem no montante financeiro, estão diretamente relacionadas com o tempo dispendido no desenvolvimento de novas entidades químicas (NCEs, *new chemical entities*), e, que podem perdurar por até 15 anos, desde o planejamento até a introdução do fármaco no mercado, além disso, é estimado que se estude aproximadamente 10 mil compostos para que apenas um fármaco consiga ser comercializado (figura 1.1) [2].

Figura 1.1 – Estágios necessários para introduzir um fármaco no mercado [2].

Como ilustrado na figura 1.1, o processo para introdução de um novo fármaco no mercado é composto de quatro fases e inicia-se a partir da pesquisa e identificação de NCEs, que possam apresentar atividade biológica para um determinado alvo terapêutico [2]. Durante o segundo estágio, **ensaios pré-clínicos**, os compostos que apresentaram atividade interessante na fase anterior são testados em laboratório e em animais com o objetivo de avaliar a toxicidade e eficácia terapêutica antes de serem testados em humanos. Em média, apenas 5 em cada 10 mil compostos são aprovados nestas duas fases iniciais e o tempo para alcançar esses resultados chegam a seis anos e meio [2].

Uma vez identificado os compostos que apresentam perfil farmacológico aceitável (atividade farmacológica específica e perfil de toxicidade admissível), é necessário a autorização das agências regulatórias para iniciar os testes clínicos em humanos, **ensaios clínicos**, a fim de investigar o novo candidato a fármaco (IND, *investigational new drug*). Esses testes clínicos consistem de três fases [1, 2]: na **fase I**, avaliam-se a segurança, a tolerabilidade (níveis de dosagem e efeitos colaterais), os perfis farmacocinético e farmacodinâmico em um grupo de 20 – 100 voluntários sadios [1, 2, 5]. Esta primeira fase pode durar meses ou prolongar-se por até um ano e meio [5]; a **fase II** tem o objetivo de avaliar a eficácia, estabelecer a segurança do composto a curto prazo, e estabelecer as relações dose-resposta em grupo de centenas de pacientes afetados por uma determinada enfermidade ou condição patológica [1, 5]. A segunda fase pode ter a duração de 1 a 3 anos [5]; a **fase III** baseia-se em estudos realizados em grandes e variados grupos de pacientes, em torno de 800 pessoas afetadas pela doença, e visa estabelecer a eficácia do composto, monitorar as reações adversas quando usados a longo prazo e também, explorar características do composto, como por exemplo, interações clinicamente relevantes [1,5]. Esta fase pode ter a duração de 2 a 6 anos [5].

Concluídos os ensaios clínicos, o próximo passo é solicitar às agências regulatórias a requisição de um novo fármaco (NDA, *new drug application*) antes de sua comercialização, e pode perdurar de meses até anos até a sua aprovação [2, 5]. Uma vez que o fármaco torna-se apto para uso comercial, iniciam-se os estudos da fase IV, **farmacovigilância**, baseados principalmente na vigilância pós-comercialização [1].

Apesar da indústria farmacêutica ser a que mais investe em pesquisa, desenvolvimento e inovação, o que em números representa cerca de 20% do seu faturamento em vendas [6], o número de NCEs aprovadas tem decrescido anualmente (figura 1.2), atingindo um de seus menores índices em 2009 [7]. Por outro lado, as NCEs que não são aprovadas durante qualquer etapa do desenvolvimento de fármacos resultam em enormes perdas financeiras, fazendo com que as empresas ou indústrias farmacêuticas agreguem este valor investido sobre as NCEs que obtiveram sucesso, resultando no custo elevado para se adquirir um medicamento [5].

Figura 1.2 – Novas moléculas aprovadas pelo FDA no período de 1996-2009. Os dados referentes ao período de 1996 – 2006 foram retirados da ref. [8], enquanto que os dados de 2007 foram extraídos da ref. [9] e de 2008 e 2009 da ref. [7].

A principais razões pelas falhas no desenvolvimento de novos fármacos, ilustradas na figura 1.3, estão relacionadas com a farmacocinética/biodisponibilidade inapropriadas, ou seja, problemas de absorção, distribuição, metabolismo (biotransformação) e/ou excreção (ADME) das NCEs, perda de eficácia de NCEs, a observação de efeitos tóxicos nos ensaios realizados em animais na fase pré-clínica, e a detecção de efeitos adversos nas fases

clínicas, além das razões comerciais, que são consideradas falhas não-científicas, e estão relacionadas, por exemplo, ao abandono de projetos devido a fusões de empresas, acarretando o redirecionamento dos recursos para setores do mercado que são mais atraentes financeiramente [10, 11].

Figura 1.3 – Razões de falhas no processo de desenvolvimento de novos fármacos [10,11].

Estes índices de insucessos aliados ao alto custo e ao longo período dispendidos fazem com que diferentes abordagens teóricas sejam utilizadas como ferramentas para facilitar e acelerar o processo envolvido na criação de novos medicamentos [12, 13]. A escolha da abordagem irá depender do conhecimento prévio ou não de informações sobre um alvo biológico e das substâncias que irão interagir com este possível alvo [12]. A situação mais comum é aquela em que há um conjunto de compostos biologicamente ativos (ligantes) e ausência de informações sobre o receptor biológico (alvo)[12].

Assim, o foco de pesquisadores e indústrias farmacêuticas direciona-se para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de compostos-protótipos (*lead compounds*) [5, 14], e/ou para a exploração de novos usos para os fármacos já aprovados, utilizando estratégias de modificação estrutural, com o objetivo de alterar suas propriedades farmacológicas e

farmacocinéticas [15, 16].

O **composto-protótipo** é uma estrutura química definida, que apresenta características farmacológicas interessantes, mas que também é provida de propriedades indesejáveis, tais como toxicidade, insolubilidade ou problemas de ADME. Sua estrutura serve como modelo para o planejamento e síntese de novos análogos, que apresentem uma melhoria em suas características desejáveis e que, ao mesmo tempo, não manifestem as características não-desejáveis anteriormente detectadas [5, 17]. Segundo a definição da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) [18], um composto análogo é aquele cuja estrutura química está relacionada com a de outro composto, mas as propriedades químicas e biológicas podem ser bastante diferentes. De acordo com WERMUTH (2008) [14], um análogo é uma molécula que compartilha similaridades terapêuticas e químicas com o composto original, e que estes podem ser classificados em três tipos:

i) **análogos verdadeiros:** apresentam similaridade química e farmacológica e geralmente são referidos como compostos “*me-too*” [14,19]. São compostos muito similares a um fármaco conhecido, entretanto apresentam diferenças farmacoterapêuticas [20]. Um exemplo de fármaco “*me-too*” é a ranitidina (**8¹**) (figura 1.4), planejada a partir de modificações do anel imidazólico e do grupamento funcional cianoguanidina do protótipo cimetidina (**9**) [20];

Figura 1.4 – Exemplo de análogos verdadeiros.

¹ A numeração das estruturas químicas descritas durante este trabalho, iniciarão a partir do número 8, cabendo aos compostos desenvolvidos nesta tese a numeração de 1 – 7.

ii) **análogos estruturais:** originalmente planejados a partir de um composto protótipo, com um propósito definido, mas demonstraram propriedades farmacológicas inesperadas durante os ensaios biológicos [14, 18]. Um exemplo deste tipo de análogo é a sildenafil (**10**) (figura 1.5), fármaco originalmente planejado a partir da EHNA (*eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-adenina*) (**11**) e zaprinast (**12**), para atuar como inibidor de fosfodiesterases, no tratamento de angina [19]. Durante os estudos clínicos, a sildenafil demonstrou baixa eficácia terapêutica dos efeitos cardiovasculares, no entanto, exibiu inesperada atividade sobre a disfunção erétil [20];

Figura 1.5 – Exemplo de análogos estruturais.

iii) **análogos funcionais:** apresentam similaridade farmacológica sem apresentarem similaridade química em comum [14, 19]. Análogos funcionais foram, durante muito tempo, o resultado imprevisível de observações fortuitas [19]. Exemplos deste tipo de análogos, são os tranquilizantes diazepam (**13**) e zopiclone (**14**) (figura 1.6). Apesar de terem estruturas químicas totalmente diferentes, compartilham a afinidade para os receptores benzodiazepínicos [14,19].

Figura 1.6 – Exemplo de análogos funcionais.

1.2 Estudos de QSAR

O planejamento racional por aplicação de estudos das Relações Quantitativas entre Estrutura Química e Atividade Biológica (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationships*) é uma das estratégias utilizadas no desenvolvimento de fármacos e estuda a influência qualitativa e quantitativa das propriedades físico-químicas e estruturais responsáveis pela atividade biológica de uma série de compostos, estruturalmente similares, definindo assim, modelos matemáticos com capacidade preditiva, equação 1.1.

$$\text{Atividade Biológica} = f(\text{propriedades físico-químicas e/ou estruturais}) \quad (\text{Eq. 1.1})$$

De maneira geral, os modelos obtidos permitem a previsão da atividade biológica da série de compostos testada e permite também a previsão desta atividade para compostos relacionados que ainda não foram testados, além de estabelecer quais são as propriedades físico-químicas pertinentes para a atividade biológica destes compostos. Além disso, esses estudos podem ser aplicados não apenas para correlacionar a atividade biológica, mas podem ser expandidos para outras áreas da química medicinal, onde são investigadas a correlação com outras funções, tais como, com propriedades (QSPR, *Quantitative Structure-Property Relationships*), com toxicidade (QSTR, *Toxicity*) e com seletividade (QSSR, *Selectivity*) dos compostos [21].

Os primeiros modelos de QSAR que correlacionaram as propriedades físico-químicas de compostos orgânicos foram a **Análise de Hansch** e o **modelo de Free-Wilson**, ambos em 1964 [22]. Desde então, diferentes abordagens de QSAR foram desenvolvidas ao longo das últimas décadas, as quais diferem principalmente na maneira de como é feita a descrição e a representação estrutural dos compostos [12, 23]: os modelos unidimensionais, **QSAR-1D**, consideram apenas a fórmula molecular do composto, o que reflete apenas a sua composição, e tem o seu uso limitado para fins auxiliares; os modelos bidimensionais, **QSAR-2D**, contém informações a respeito da estrutura de uma série de

compostos. Uma vez que são baseados apenas em fórmulas estruturais, os modelos refletem apenas a topologia da molécula; os modelos tridimensionais, **QSAR-3D** [24], contém informações estruturais completas, entretanto, as informações a respeito da composição, topologia e da forma espacial da molécula é provinda de apenas um confôrmero. Uma vez que o confôrmero representa apenas o arranjo dos átomos em um determinado momento, a escolha do confôrmero analisado pode não representar a conformação bioativa da estrutura[12]; nos modelos quadridimensionais, **QSAR-4D** [25], a descrição da estrutura molecular é realizada de forma mais adequada. Esses modelos são semelhantes aos modelos 3D, entretanto a informação estrutural é considerada para um conjunto de confôrmeros ao invés de apenas para uma conformação. Desta forma, os estudos de QSAR-4D incorporam a liberdade conformacional aos modelos de QSAR-3D.

Além destes quatro métodos, citam-se outras abordagens multidimensionais, que necessitam do reconhecimento prévio do sítio receptor. A abordagem de **QSAR-5D** [26, 27], se assemelha ao QSAR-4D, mas adiciona representações explícitas de diferentes modelos de ajuste induzido; o método de **QSAR-6D** é semelhante ao QSAR-5D [28] e adiciona a representação de diferentes cenários de solvatação.

1.2.1 Origem e Evolução

As técnicas utilizadas em QSAR surgiram desde 1863, quando **Cros** observou que a toxicidade de álcoois em mamíferos aumentava a medida que a solubilidade em água diminuía [29]. Posteriormente, em 1868, **Crum-Brown** e **Fraser** postularam que as atividades fisiológicas das substâncias poderiam ser correlacionadas com a sua composição e constituição química, entretanto, não demonstraram como representar a estrutura química em termos quantitativos [30, 31]. No mesmo ano, **Richardson** demonstrou que a atividade entorpecente de álcoois era proporcional ao seu peso molecular [32]. Abrangindo para o campo de QSPR, **Mills** desenvolveu em 1884, um modelo de QSPR para predição dos pontos de fusão e ebulição em séries homólogas, com precisões melhores do que um grau [33]. Em 1893, **Richet** correlacionou a toxicidade para um conjunto de álcoois, éteres e

cetonas com a solubilidade em água e mostrou que as citotoxicidades são inversamente relacionadas com as correspondentes solubilidades em água [34]. Na década de 1890, **Meyer** [35], e **Overton** [36], trabalhando de maneira independente, correlacionaram o coeficiente de partição de um grupo de compostos orgânicos com sua potência anestésica, e observaram uma relação linear entre a atividade e a lipofilicidade das moléculas. As observações feitas em 1907 por **Fühner** e **Neubauer**, de que a atividade narcótica de séries homólogas aumentava em progressão geométrica, trouxeram a primeira indicação de aditividade de contribuições de grupos em uma escala logarítmica [22, 32].

Em 1939, **Ferguson** estudou o comportamento de propriedades diversas, tais como solubilidade em água, a distribuição entre fases, capilaridade e pressão de vapor em diferentes séries homólogas e correlacionou com sua ação depressora [37]. Ele observou que a potência da atividade dos compostos aumenta até um certo ponto, e a partir deste, acontece uma perda ou decréscimo da mesma. Ferguson introduziu conceitos de termodinâmica para interpretar tais relações não-específicas, assim como para explicar a frequência dos pontos de corte da ação depressora observados além de determinado intervalo de lipofilicidade [32].

A maior contribuição entretanto, deve-se a **Hammett**. Em meados da década de 1930 [38], Hammett observou que a adição de grupos substituintes no anel aromático de ácidos benzóicos, em posições *meta* ou *para*, produzia efeito ordenado e quantitativo na constante de ionização ácida, K_a , figura 1.7.

Figura 1.7 – Reação de ionização de ácidos benzóicos *para* ou *meta* substituídos.

[K_X = constante de ionização de ácidos benzóicos X-substituídos; K_H = constante de ionização do ácido benzóico não-substituído]

Desta forma, foi definido o parâmetro eletrônico **σ de Hammet**, equação 1.2, a partir da relação logarítmica entre os valores de $\log K_x$ (logaritmo da K_a para o correspondente ácido benzóico X -substituído) e de $\log K_H$ (logaritmo da K_a para o correspondente ácido benzóico não-substituído) [39, 40].

$$\sigma = \log (K_x / K_H) \quad \text{ou} \quad \sigma = \log K_x - \log K_H \quad (\text{Eq. 1.2})$$

A **constante σ** é denominada constante de grupo, uma vez que caracteriza o comportamento eletrônico de um dado grupo substituinte. Os valores absolutos de σ refletem a grandeza do efeito eletrônico, sejam eles indutivos ou de ressonância, exercidos pelo substituinte sobre o centro de reação ou sobre a propriedade físico-química medida. Valores positivos de σ são observados para grupos substituintes retiradores de elétrons, enquanto que valores negativos são observados em substituintes doadores de elétrons [39, 40].

A partir dos valores de σ obtidos para diversos grupos substituintes, Hammet propôs uma relação linear de energia livre, conhecida por *Equação de Hammet* [32, 41, 42], equação 1.3, na qual a constante de reação, ρ , indica a susceptibilidade da reação ao efeito eletrônico exercido pelo substituinte X [37]. O valor de ρ é positivo quando a reação é favorecida por grupos que atraem elétrons e negativo quando a reação é favorecida por grupos que doam elétrons [43].

$$\log K_x = \rho \sigma + \log K_H \quad (\text{Eq. 1.3})$$

Em 1952, **Taft** [44] estudou a hidrólise ácida de ésteres alifáticos alfa-substituídos (XCH_2COOR) e propôs que o efeito eletrônico de grupo substituinte (X) na hidrólise destes compostos era desprezível sendo a velocidade da reação dependente do volume de X , introduzindo assim o parâmetro estérico **E_s** . O parâmetro **E_s** é definido como sendo a relação logarítmica entre as constantes de velocidade da hidrólise ácida do éster

substituído (k_x) e do éster não substituído (k_H), equação 1.4. Entretanto, este parâmetro tem pouca significância e sua utilização é criticada, uma vez que outros fatores influenciam as reações de hidrólise tomadas como padrão [39, 40].

$$Es = \log (k_x / k_H) \quad (\text{Eq. 1.4})$$

Taft e Lewis [45], em 1958, propuseram a decomposição das contribuições exercidas pelos efeitos indutivos, σ_I , e de ressonância, σ_R , de grupos substituintes em posições meta, σ_m , e para σ_p , em anéis benzênicos, de acordo com as equações 1.5 e 1.6.

$$\sigma_m = \sigma_I + \sigma_R \quad (\text{Eq. 1.5})$$

$$\sigma_p = \sigma_I + \sigma_R \quad (\text{Eq. 1.6})$$

A separação do parâmetro σ em seus componentes indutivo e de ressonância possibilitou a utilização da *Equação de Hammett expandida*, equação 1.7, pela qual se torna possível a análise das contribuições relativas dos efeitos indutivos e de ressonância separadamente [40].

$$\log K_x = \rho_I \sigma_I + \rho_R \sigma_R + \log K_H \quad (\text{Eq. 1.7})$$

Em que:

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

ρ_I = constante de reação relacionada ao efeito indutivo;

σ_I = contribuição do efeito indutivo;

ρ_R = constante de reação relacionada ao efeito de ressonância;

σ_R = contribuição do efeito de ressonância;

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

Trabalhando na mesma direção, **Swain** e **Lupton**, anos mais tarde, propuseram o desmembramento do efeito eletrônico de grupos substituintes no efeito indutivo ou de campo, $\mathfrak{J}$ (*field*), e no efeito de ressonância, $\mathfrak{R}$ (*resonance*) [32].

As bases dos estudos de QSAR como praticado hoje, começaram a partir dos estudos de **Muir** e **Hansch** [46], em 1962, que estudaram a atividade biológica de reguladores de crescimento vegetal e correlacionaram com as constantes de Hammett e com a hidrofobicidade. Em 1964, duas contribuições independentes foram publicadas, uma por Free e Wilson [47], e a outra por Hansch e Fujita [48], e ambas são consideradas o marco inicial dos estudos de QSAR [32].

O modelo de **Free-Wilson**, na versão escrita por Fujita e Ban, aborda o aspecto da contribuição aditiva, ou seja, a atividade biológica é correlacionada como a simples soma das diferentes contribuições dos grupos substituintes [32].

O modelo de relação linear de energia livre, proposto por **Hansch** e **Fujita** [48], demonstrou pela primeira vez, a correlação da atividade biológica de compostos orgânicos com parâmetros físico-químicos, e a participação de múltiplas propriedades que podem influenciar esta atividade, equação 1.8. Este modelo ficou conhecido por **Análise de Hansch**, e posteriormente, novos modelos foram propostos afim de descrever a dependência não linear da atividade biológica da lipofilicidade dos compostos [49, 50]

$$\log 1/C = a \log P + b \sigma + c E_s + \text{constante} \quad (\text{Eq. 1.8})$$

Em que:

$\log 1/C$ = logaritmo da atividade biológica do composto;

C = concentração do composto em mol/L;

$\log P$, σ , E_s = parâmetros físico-químicos que expressam as interações envolvidas (hidrofóbicas, eletrônicas e estéricas respectivamente);

a, b, c = coeficientes que expressam as contribuições relativas de cada parâmetro de dados utilizados;

Hansch e Fujita, no mesmo ano, definiram o **parâmetro π** , que representa a hidrofobicidade de um determinado grupo substituinte. Este parâmetro é definido como sendo a relação entre o logaritmo do coeficiente de partição de um composto substituído ($\log P_x$) e o logaritmo do coeficiente de partição de seu análogo não-substituído ($\log P_H$) [22], equação 1.9.

$$\pi_x = \log P_x - \log P_H \quad (\text{Eq. 1.9})$$

O parâmetro π de Hansch-Fujita tem sido bastante utilizado como medida da contribuição hidrofóbica de grupos substituintes, uma vez que mede a contribuição individual desses grupos para o coeficiente de partição de uma molécula [22, 39, 40]. A posição do grupo substituinte influi significativamente no valor da constante de hidrofobicidade π , sendo possível observar diferentes valores para um mesmo grupo substituinte em função de sua posição na molécula [22, 40]. Por definição, valores positivos de π de Hansch são encontrados para grupos substituintes com caráter mais lipofílico, enquanto que valores negativos apresentam caráter mais hidrofílico [22, 40].

Paralelamente a estas técnicas, foram desenvolvidos, principalmente por **Wiener** [51], **Kier e Hall** [52, 53], e **Randic** [54], os estudos que consideravam que a atividade biológica estava relacionada com as características topológicas de moléculas, numericamente representados por meio dos índices de distância e índices de conectividade.

A inclusão da influência da estereoquímica e das diferentes conformações adotadas pelas moléculas nos estudos de QSAR fazia-se necessária. Em 1979, **Cramer** introduziu uma nova abordagem para descrever os campos de interação molecular calculados em uma caixa virtual (*grid*). Essa abordagem, denominada sistema de modelagem molecular orientada por uma grade dinâmica 3D (DYLLOMS, *Dynamic Lattice-Oriented Molecular Modeling System*), envolvia a análise de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*) para extrair auto-vetores dos campos de interação molecular, que são então correlacionadas com atividades biológicas [32, 33]

Em 1988, **Cramer** publicou o primeiro trabalho no qual utilizou a análise de mínimos quadrados parciais (PLS, *partial least squares*) para correlacionar os campos de

interação molecular com os valores de atividade biológica [24, 55]. Este método ficou conhecido como análise comparativa de campos moleculares (CoMFA, *Comparative Molecular Field Analysis*), e impulsionou o campo de QSAR-3D.

A dependência do posicionamento correto das moléculas requeridas nos estudos de QSAR-3D, levaram ao desenvolvimento dos estudos de QSAR-4D. Em 1997 [25], **Hopfinger** incorporou a liberdade conformacional das moléculas em função do tempo, nos estudos de QSAR-4D. A quarta dimensão nos estudos de QSAR-4D desta forma, considera todas as possíveis conformações e orientações adotadas por um composto orgânico. Em 2000, **Vedani** introduziu a abordagem QSAR-5D [26, 27], incluindo em seus modelos, além da liberdade conformacional, o modelo de ajuste induzido que ocorre durante a interação de uma molécula com o seu sítio receptor, considerando assim, as alterações que ocorrem tanto da molécula quanto do alvo. Em 2005 [28], Vedani inclui vários cenários de solvatação, os quais consideram, além das propriedades do QSAR-4D e 5D, as interações das moléculas dos compostos com as moléculas do solvente.

1.2.2 Interação Fármaco-Receptor

O conceito dos estudos de QSAR é baseado nos efeitos resultantes da interação entre um fármaco com um determinado sítio específico, denominados receptores ou biorreceptores [21, 56]. A afinidade com que este fármaco interage com seu receptor, assim como atividade intrínseca desencadeada, são determinadas por sua estrutura química, desta forma, modificações relativamente pequenas na molécula do fármaco podem resultar em alterações importantes na resposta farmacológica [5, 56, 57].

As interações fármaco-receptor (FR) são dependentes das forças intermoleculares não-covalentes entre ambos, uma vez que interações covalentes são irreversíveis e, portanto, indesejáveis na maioria dos casos, exceto para agentes alquilantes ou alguns quimioterápicos [22, 57 - 60]. As forças globais dessas ligações podem variar e determinar o grau de afinidade entre o fármaco e o receptor, uma vez que atuam em conjunto [61], ilustrados na figura 1.8.

Figura 1.8 –Receptor biológico hipotético e algumas interações FR [58].

As **interações eletrostáticas**, que podem ser do tipo iônicas, dipolo–dipolo e íon–dipolo, ligação de hidrogênio e transferência de carga, são consideradas forças de atração uma vez que os campos eletrostáticos que envolvem um receptor indicam a orientação correta do fármaco e são responsáveis pelo primeiro contato entre ambos [22]. A intensidade destas interações é dependente tanto do valor da constante dielétrica do meio quanto da geometria e das distâncias envolvidas entre as moléculas do fármaco e do receptor [22].

As **interações iônicas** são importantes na ação de fármacos ionizáveis, uma vez que atuam em longas distâncias comparadas com outros tipos de interações [59]. Estas interações ocorrem entre íons de cargas opostas, e sua intensidade é diretamente dependente da natureza de cada íon e inversamente dependente da constante dielétrica do solvente e da distância entre as cargas [22]. A maioria dos receptores possuem grupos ionizáveis (COO^- , $-\text{O}^-$, NH_3^+) em pH fisiológico que estão acessíveis para serem ligados com fármacos ionizados [59]. As **interações dipolo–dipolo** provém de moléculas constituídas por diferentes átomos, os quais apresentam uma assimetria no compartilhamento de elétrons, resultando no surgimento de dipolos. Em uma molécula composta de átomos com diferentes eletronegatividades, por exemplo, oxigênio, nitrogênio, enxofre e halogênio, os átomos com menor eletronegatividade ficam com cargas parciais positivas (δ^+), enquanto os átomos com maior eletronegatividade ficam com cargas parciais negativas (δ^-). Assim, os dipolos de um fármaco podem ser atraídos por íons gerando **interações íon–dipolo**, ou por outros dipolos, gerando interações dipolo-dipolo [62]. Uma vez que a carga de um dipolo é menos intensa do que a de um íon, a interação dipolo-dipolo é relativamente mais fraca que

a íon-dipolo, e ambas, mais fracas que interações iônicas [62].

As **ligações de hidrogênio** são ligações dipolo-dipolo mais intensas, medidas tanto sob o ponto de vista energético quanto sob o ponto de vista de distâncias interatômicas, e são as responsáveis pela manutenção da conformação de receptores e também da própria interação FR [57, 59]. Estas ligações se estabelecem por interações eletrostáticas entre heteroátomos eletronegativos (O, S, N) e o átomo de hidrogênio de ligações O – H, N – H, CF₂ – H, que são deficientes de elétrons [57]. Os complexos de **transferência de carga** são formados entre moléculas com caráter doador de elétrons e moléculas retiradoras de elétrons e geralmente estão envolvidas na interação FR [59].

Além das forças eletrostáticas de atração, também participam do processo de interação, forças de dispersão e ligações hidrofóbicas. As **forças de dispersão**, também conhecidas como forças de dispersão de London ou interações de van der Waals, são interações estabelecidas em moléculas apolares, nas quais a nuvem eletrônica é distribuída de maneira uniforme, entretanto, podem ser deformadas pela movimentação dos elétrons, levando assim, ao surgimento de um dipolo momentâneo [62]. Estas ligações são fracas, mas apresentam importância no processo de reconhecimento do receptor pelo fármaco [59].

As **interações hidrofóbicas** ocorrem entre as moléculas apolares que se encontram solvatadas no meio biológico [62]. Com a aproximação entre as regiões hidrofóbicas, as moléculas de água tendem a se desorganizar e com isso ocorre a interação FR. Estas ligações são fracas e a energia para gerar estas ligações provém da desorganização gerada anteriormente [59]. Estas interações são importantes para o reconhecimento do fármaco pelo seu receptor [59].

Desta forma, a afinidade de um fármaco com seu seu alvo específico é dependente de suas características tridimensionais, tais como, dimensão, orientação estereoquímica de seus grupos funcionais, propriedades físicas e eletroquímicas [61]. Uma vez que o sistema biológico seja mantido constante, as variações em um fármaco, causadas por mudanças estruturais em sua molécula, podem ser correlacionadas com a afinidade relativa desses compostos bioativos para este mesmo receptor, ou seja, o grau de intensidade e afinidade da ligação de um composto, com ou sem determinado grupo funcional, reflete apenas os

fatores associados a esse grupo [22]. Assim, **parâmetros** que descrevem as características estruturais e as propriedades moleculares que são diretamente relacionadas com as forças intermoleculares envolvidas na interação FR, e que igualmente descrevem as propriedades relacionadas ao transporte e à distribuição no sistema biológico, são usados para correlacionar, de modo quantitativo, as variações na resposta biológica com mudanças na estrutura química, em série de compostos análogos [22, 40, 58].

Estima-se que mais de 3.000 descritores já estejam disponíveis [32, 63], e a escolha de quais parâmetros deverão ser utilizados, dependerá principalmente do modelo de QSAR adotado, assim como, das características estruturais que serão investigadas.

1.3.3 Planejamento de Série de Compostos para estudos de QSAR

Os estudos de QSAR são ferramentas bastante úteis para serem aplicadas na otimização das características farmacodinâmicas e farmacocinéticas de um composto-protótipo, e quando sua utilização é bem sucedida pode direcionar para a identificação de um novo composto-protótipo otimizado, com potencial para ser um candidato a fármaco. A otimização de tais características é alcançada a partir de estudos sistemáticos, figura 1.9.

Figura 1.9 – Estudo sistemático para identificação de candidatos a fármacos por aplicação de estudos de QSAR [40].

Para desenvolver um modelo de QSAR válido e confiável, existem etapas e requisitos que devem ser seguidos:

i) Seleção de Compostos: o primeiro passo consiste na seleção das atividades biológicas de interesse, a escolha do composto protótipo e a escolha de características estruturais a serem variadas. Uma vez que a resposta normalmente difere entre os diferentes tipos de compostos, não é desejável que os modelos de QSAR sejam desenvolvidos a partir de compostos estruturalmente muito diversos. No entanto, os compostos devem ser diferentes a ponto de causar alguma variação na atividade biológica [22, 64]. A seleção dos compostos químicos adequados para desenvolver modelos de QSAR é de grande importância para obtenção de resultados válidos, e o conjunto de dados deve ser constituído por aqueles compostos que exerçam determinado efeito biológico através de um mecanismo de ação que possa ser explicado pelo modelo de QSAR [22, 65]. em estudos de QSAR-2D, a exigência de **similaridade química** e **homogeneidade** dos compostos implica na necessidade de que todos os compostos investigados devam ter o mesmo mecanismo de ação assim como implica o estabelecimento de limites sobre a variabilidade e diversidade das estruturas químicas e propriedades [22]. Dessa forma, evita-se, previamente, a presença de *outliers* e aglomeração (*clustering*). Os *outliers* são compostos que não se encaixam no modelo, ou são mal previstos pelo mesmo [66]. A aglomeração acontece quando os compostos podem ser divididos em diferentes sub-grupos, desta forma, a opção de tratar cada classe de forma independente deve ser considerada [65]. A **representatividade** é um requisito importante na escolha dos grupos substituintes que irão formar o conjunto de compostos. Quando a série é mal planejada, reflete em intercorrelação entre as propriedades estudadas, refletindo em interpretações errôneas dos modelos obtidos [22]. Vários métodos de seleção podem ser utilizados, tais como Diagrama de Craig [67], Método Operacional de Topliss [68] e Análise de Cluster [69].

ii) Seleção dos Descritores: quando um grande número de descritores são calculados, alguns deles podem conter informações redundantes, o que resulta no problema de colinearidade. Os descritores selecionados no modelo de QSAR devem ser significativos, e facilmente interpretáveis. Assim, os descritores selecionados deverão fornecer informações valiosas e relevantes sobre o mecanismo de ação dos compostos [66].

iii) Atividade Biológica: em estudos de QSAR, é imperativo que os dados biológicos sejam exatos e precisos para desenvolver um modelo significativo[27]. As

atividades devem ser medidas de forma coerente e de acordo com ensaios biológicos padronizados. Quando os dados são extraídos da literatura é conveniente usar apenas uma única fonte. Além disso, a compreensão do mecanismo de ação dos compostos químicos auxilia na detecção e explanação de *outliers* do modelo [66].

Os seguintes tipos de dados de atividade biológica podem ser utilizados em estudos QSAR, desde que estejam na escala correta: valores de atividade biológica *in vitro* (usando culturas de bactérias, fungos e outros, bem como órgãos isolados) e *in vivo* (atividades farmacodinâmicas e tóxicas de fármacos), dados de afinidade; constantes de inibição, especialmente valores de K_i e IC_{50} de diferentes enzimas, dentre outros [22]. Apenas as constantes K_i e IC_{50} (não % de absorção ou % de concentração) e constantes de velocidade (como valores de $\log k$ e não % de absorção ou % de concentração) são apropriados para estudos de QSAR, uma vez que estão relacionadas com valores de energia livre de Gibbs (ΔG), o que significa que todos os outros dados biológicos devem ser transformados de maneira apropriada antes de serem usados em análises quantitativas [27].

Normalmente, os dados são convertidos à escala logarítmica, transformando a concentração de um efeito desejado, $[C]$, para uma atividade por uma expressão logarítmica, $\log (C)$ ou $\log (1/C)$, que aumenta com a eficácia do composto, devido, em muitos ensaios, aos compostos que apresentam uma boa atividade biológica em baixas concentrações [22]. Além disso, os dados de atividade biológica devem ser razoavelmente distribuídos sobre toda a faixa de valores, sem agrupamentos de dados [22, 27]

iv) Análise do modelo de QSAR: Para calcular a melhor expressão matemática que relaciona os descritores físico-químicos com a atividade biológica, as informações sobre as propriedades essenciais dos conjuntos de compostos e dados biológicos devem ser obtidos. A análise de QSAR também fornece a informação acerca da relevância de descritor determinado. De modo geral, os modelos obtidos devem ser simples e compreensíveis do ponto de vista mecanístico [65]. Na análise estatística, devem-se evitar o *overfitting* (super ajuste) e a não-colinearidade dos dados. O *overfitting* consiste na obtenção de valor elevado do coeficiente de correlação decorrente do número excessivo de variáveis incluídas no modelo e não de seu ajuste natural aos valores observados da atividade [70].

v) Validação e predição do modelo: o objetivo final do estudo de QSAR é prever a atividade biológica de compostos não-testados que pertencem à classe sob investigação. Dessa forma, a capacidade preditiva do modelo é verificada experimentalmente, feito por testes biológicos de alguns compostos adicionais assim como comparando os resultados experimentais com os valores previstos pelo modelo de QSAR [71]. Se o modelo de QSAR prevê os valores do efeito biológico dentro de limites aceitáveis, pode ser usado para aplicações mais extensas. Os erros de previsão devem ser comparados com a precisão e o alcance das medidas biológicas obtidas [65].

O processo de estudos de QSAR, predição da propriedade alvo, síntese e ensaios biológicos persiste até que novas moléculas sejam selecionadas como possíveis candidatas a fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Definições em Pesquisa Clínica. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 21 Jun 2010.
- [2] UNITED STATES GOVERNMENT ACCOUNTABILITY OFFICE (GAO). (2006) “New drug development. Science, business, regulatory, and intellectual property issue cited as hampering drug development efforts”. Disponível em: <<http://www.gao.gov>>. Acesso em: 21 Jun 2010.
- [3] DIMASI, J., HANSEN, R., GRABOWSKI, H. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ.* 22, 151–185, **2003**.
- [4] ADAMS, C.P., BRANTNER, V.V. Spending on new drug development. *Health Econ.* 19, 130–141, **2010**.
- [5] SILVERMAN, R. B. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action. 2.ed. Califórnia: Elsevier Academic Press, **2004**.
- [6] GUERRA, R. Buscando uma política de medicamentos para o Brasil. São Paulo: Febráfarma, 2007. In: CALIXTO, J.B., SIQUEIRA JR, J.M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gaz Méd Bahia.* 78, 98 – 106, **2008**.

- [7] VAN BRUNDT, J. (2010) "Biotech Drug Approvals: A Year Of Firsts". Signals Magazine, Feb. 9, 2010. Disponível em: <[http:// www.signalsmag.com/](http://www.signalsmag.com/)>. Acesso em: 22 Jun 2010.
- [8] SCHMID, E. F., SMITH, D. A. R&D technology investments: misguided and expensive or a better way to discover medicines? *Drug Discov Today*. 11, 775 – 784, **2006**.
- [9] CALIXTO, J.B., SIQUEIRA JR, J.M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gaz Méd Bahia*. 78, 98 – 106, **2008**.
- [10] BROWN, D. Unfinished business: target-based drug discovery. *Drug Discov Today*. 12, 1007 – 1012, **2007**.
- [11] KOLA, I., LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*. 3, 711 – 716, **2004**.
- [12] KUZ'MIN, V.E., ARTEMENKO, A.G., POLISCHUK, P.G., MURATOV, E.N., HROMOV, A.I., LIAHOVSKIY, A.V., ANDRONATI, S.A., MAKAN, S.Y. Hierarchic system of QSAR models (1D-4D) on the base of simplex representation of molecular structure. *J Mol Model*. 11, 457 467, **2005**.
- [13] THOMAS, G. Química Medicinal – Uma Introdução. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2003**.
- [14] WERMUTH, C.G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses. In: WERMUTH, C.G., ed. The Practice of Medicinal Chemistry. 3.ed. Oxford:Elsevier, **2008**. p. 125 – 143.
- [15] ASHBURN, T.T., THOR, K.B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 3, 673 – 683, **2004**.
- [16] CHONG, C.R., SULLIVAN, D.J. New uses for old drugs. *Nature*. 448, 645 – 646, **2007**.
- [17] LIMA, L.M. Química Medicinal Moderna: Desafios e Contribuição Brasileira *Quim. Nova*. 30, 1456 – 1468, **2007**.

- [18] WERMUTH, C.G., GANELLIN, C.R., LINDBERG, P., MITSCHER, L.A. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure Appl Chem.* 70, 1129 – 1143, **1998**.
- [19] WERMUTH, C.G. Similarity in drugs: reflections on analogue design. *Drug Discov Today.* 11, 348 – 354, **2006**.
- [20] BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (Pronfar). *Quím Nova.* 28, S56 – S63, **2005**.
- [21] BROWN, N., LEWIS, R.A. Exploiting QSAR methods in lead optimization. *Curr Opin Drug Discov.* 9, 419-424, **2006**.
- [22] KUBINYI, H. QSAR: Hansch analysis and related approaches. New York:VCR, **1993**.
- [23] LILL, M.A. Multi-dimensional QSAR in drug discovery. *Drug Discov. Today.* 12, 1013 – 1017, **2007**.
- [24] CRAMER III, R.D., PATERSON, D.E., BUNCE, J.D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J Am Chem Soc.* 110, 5959-5967, **1988**.
- [25] HOPFINGER, A. J., WANG, S., TOKARSKI, J. S., JIN, B., ALBUQUERQUE, M., MADHAV, P.J., DURAISWAMI, C. Construction of 3D-QSAR models using the 4D-QSAR analysis formalism. *J Am Chem Soc.* 119, 10509-10524, **1997**.
- [26] VEDANI, A., DOBLER, M. Multidimensional QSAR: Moving from three- to five-dimensional concepts. *Quant Struct-Act Relat.*, 21, 382-390, **2002**.
- [27] VEDANI, A., DOBLER, M. 5D-QSAR: The key for simulating induced fit? *J Med Chem.* 45, 2139-2149, **2002**.
- [28] VEDANI, A., DOLLINGER, H., HASSELBACH, K.M. DOBLER, M, LILL, M.A: Novel ligands for the chemokine receptor-3 (CCR3): A receptor modeling study based on 5D-QSAR. *J Med Chem.* 48, 1515-1527, **2005**.

- [29] BEVAN, D.R. "QSAR and Drug Design". Network Science Corporation - NetSci (**2010**). Disponível em: < <http://www.netsci.org/Science/>>. Acesso em: 18 Jul 2010.
- [30] CRUM-BROWN, A., FRASER, T.R. On the connection between chemical constitution and physiological action. Part 1. On the physiological action of the ammonium bases, derived from Strychia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia and Nicotia. *Trans Roy Soc Edinburgh*. 25, 151-203, **1868**.
- [31] CRUM-BROWN, A., FRASER, T.R. On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action. Part II. - On the Physiological Action of the Ammonium Bases derived from Atropia and Conia. *Trans Roy Soc Edinburgh*. 25, 693-739, **1869**.
- [32] KUBINYI, H. From Narcosis to Hyperspace: The History of QSAR. *Quant Struct-Act Relat*. 21, 348 – 356, **2002**.
- [33] VERMA, J., KHEDKAR, V. M., COUTINHO, E. C. 3D - QSAR in drug design - a review. *Curr Top Med Chem* . 10, 95-115, **2010**.
- [34] RICHET, C. On the relationship between the toxicity and the physical properties of substances. *Compt Rendus Seances Soc Biol*. 9, 775-776, **1893**.
- [35] MEYER, H. On the theory of alcohol narcosis I. Which property of anesthetics gives them their narcotic activity? *Arch Exp Pathol Pharmacol*. 42, 109-118, **1899**.
- [36] OVERTON, E. Osmotic properties of cells in the bearing on toxicology and pharmacology. *Z Physik Chem*. 22, 189-209, **1897**.
- [37] GAUDIO, G.A. Modelos Clássicos de Estudo Quantitativo das Reações entre Estrutura Química e Atividade Biológica. *Quim Nova*. 19, 278 – 289, **1996**.
- [38] HAMMETT, L.P. Some relations between reaction rates and equilibrium constants. *Chem Rev*. 17, 125-136, **1935**.
- [39] HANSCH, C., LEO, A., Exploring QSAR: fundamentals and applications in chemistry and biology. Washington: American Chemical Society, **1995**.

- [40] TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. *Quím. Nova*. 27, 631 – 639, **2004**.
- [41] HAMMETT, L.P. The effect of structures upon the reactions of organic compounds. Benzene derivatives. *J Am Chem Soc*. 59, 96-103, **1937**.
- [42] HAMMETT, L. P., Physical Organic Chemistry. Reaction Rates, Equilibria and Mechanism. 2. ed. New York: McGraw-Hill, **1970**.
- [43] HANSCH, C., SELASSIE, C., Quantitative structure-activity relationship - a historical perspective and the future, In: JOHN, B.T., DAVID, J.T., Eds., Comprehensive Medicinal Chemistry II. Oxford:Elsevier, 43-63, **2007**.
- [44] TAFT, R.W. Polar and steric substituent constants for aliphatic and o-Benzoate groups from rates of esterification and hydrolysis of esters1. *J Am Chem Soc*. 74, 3120-3128, **1952**.
- [45] TAFT, ROBERT W., JR., LEWIS, IRWIN C. The general applicability of a fixed scale of inductive effects. II. Inductive effects of dipolar substituents in the reactivities of m- and p-substituted derivatives of benzene. *J Am Chem Soc*. 80 2436-2443, **1958**.
- [46] HANSCH, C., MALONEY, P.P., FUJITA, T., MUIR, R.M. Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with hammett substituent constants and partition coefficients. *Nature*, 194, 178-180, **1962**.
- [47] FREE, S.M., JR., WILSON, J.W. A Mathematical contribution to structure-activity studies. *J Med Chem*. 7, 395-399, **1964**.
- [48] HANSCH, C., FUJITA, T. ρ - σ - π Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J Am Chem Soc*. 86, 1616-1626, **1964**.
- [49] HANSCH, C. Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. *Acc Chem Res*. 2, 232-239, **1969**.
- [50] KUBINYI, H. Quantitative structure-activity relationships. IV. Nonlinear dependence of biological activity on hydrophobic character: a new model. *Arzneimittelforschung*. 26, 1991-1997, **1976**.

- [51] WIENER, H. Structural determination of paraffin boiling points. *J Am Chem Soc.* 69, 17-22, **1947**.
- [52] KIER, L.B., HALL, L.H., MURRAY, W.J., RANDIĆ, M. Molecular connectivity. I: Relationship to non-specific local anaesthesia. *J Pharma Sci.* 64, 1971-1974, **1975**.
- [53] KIER, L.B., HALL, L.H. Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research. Academic Press:New York, **1976**.
- [54] RANDIĆ, M. On Characterization of Molecular Branching. *J Am Chem Soc.* 97, 6609-6615, **1975**.
- [55] KUBINYI, H. 3D QSAR in Drug Design. Theory, Methods and Applications. Leiden: ESCOM, **1993**.
- [56] ROSS, E.L., Mecanismos de ação dos fármacos e a relação entre sua concentração e seu efeito. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G., ed. Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica. 8.ed., New York: McGraw-Hill, **1996**, p.21 – 30.
- [57] BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, **2008**.
- [58] ARROIO, A., HONORIO, K.M., SILVA, A.B.F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Quim Nova.* 33, 694 – 699, **2010**.
- [59] GIES, J.P., LANDRY, Y. Molecular Drug Targets. In: WERMUTH, C.G., ed. The Practice of Medicinal Chemistry. 3.ed. Oxford:Elsevier, **2008**. p. 85 – 105.
- [60] SELASIE, S.D. History of Quantitative Structure-Activity Relationships. In: ABRAHAM, D.J., ed. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Volume 1, Drug Discovery. 6.ed. New York: Willey-Interscience, **2003**. p. 1 – 49.
- [61] SAHU, V.K., KHAN, A.K.R., SINGH, R.K., SINGH, P.P. Hydrophobic, Polar and Hydrogen Bonding Based Drug-Receptor Interaction of Tetrahydroimidazo benzodiazepinones. *Am J Immunol.* 4, 33 – 42, **2008**.

[62] SHAEFFER, L. The Role of Funcional Groups in Drug-Receptor Interactions. In: WERMUTH, C.G., ed. The Practice of Medicinal Chemistry. 3.ed. Oxford:Elsevier, **2008**. p. 464 – 480.

[63] TODESCHINI, R., CONSONNI, V., PAVAN, M. DRAGON-Software for the Calculation of Molecular Descriptors. Release 1.12 for Windows. **2001**.

[64]WATERBEEMND, H.V., ROSE, S. Quantitative approaches to Structure-activity relationships. In: WERMUTH, C.G., ed. The Practice of Medicinal Chemistry. 3.ed. Oxford:Elsevier, **2008**. p. 491 – 513.

[65] PLEISS, M.A., UNGER, S.H. The design of test series and the significance of QSAR relationships. In: Ramsden, C.A. ed. Quantitative Drug Design In: HANSCH, C., SAMMES, P.G., TAYLOR, J.B. eds. In: Comprehensive medicinal chemistry, vol 4, **1990**. p. 561-587.

[66] CRONIN, M.T.D., SCHULTZ, T.W. Pitfalls in QSAR. *J Mol Struct.* 633, 39-51, **2003**.

[67] CRAIG, P.N. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. *J Med Chem.* 14, 680-684, **1971**.

[68] TOPLISS, J.G. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. *J Med Chem.* 15, 1006–1011, **1972**.

[69] HANSCH, C., UNGER, S.H., FORSYTHE, A.B. Strategy in drug design. Cluster analysis as an aid in the selection of substituents. *J Med Chem.* 16, 1217-1222, **1973**.

[70] FERREIRA, M.M.C., MONTANARI, C.A., GAUDIO, A.C.. Seleção de variáveis em QSAR. *Quím Nova.* 25, 439-448, **2002**.

[71] HANSCH. C, VERMA, R.P. A QSAR study for the cytotoxic activities of taxoids against macrophage (MΦ)-like cells. *Eur J Med Chem.* 44, 274-279, **2009**.

2

Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma nova série de derivados *[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazídicos*, análogos funcionais da nifuroxazida (Passifuril®), visando explorar a possível atividade frente a *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Planejar as alterações estruturais e selecionar os grupos substituintes;
- Planejar a síntese dos compostos, explorar rotas sintéticas alternativas e otimizar possíveis caminhos sintéticos;
- Sintetizar e identificar os compostos planejados, bem como seus intermediários;
- Determinar a atividade antibacteriana *in vitro* dos compostos obtidos frente a cepas ATCC25923 e multirresistentes (VISA3 e 3SP/R33) de *Staphylococcus aureus*;
- Determinar a atividade anti-*T.cruzi in vitro* frente a formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y);
- Construir, avaliar e interpretar modelos de QSAR-2D e QSAR-3D empregando as técnicas de Análise de Hansch e VolSurf respectivamente, afim de prever a atividades de novos compostos.

Planejamento da série de compostos

3.1 Introdução

Com o foco na identificação de novas entidades químicas que possam ser utilizadas como possíveis fármacos antibacterianos e anti-*Trypanosoma cruzi*, este trabalho visa os estudos das relações entre a estrutura química e a atividade biológica de uma nova série de compostos benzofuroxânicos, os quais foram planejados a partir de modificações estruturais da nifuroxazida (**15**), 5-nitro-2-furfurilideno-4-hidroxibenzidrazida (Passifuril®, Millet Roux), figura 3.1, fármaco utilizado nos anos 70 e 80, como primeira ou segunda escolha, no tratamento de infecções intestinais.

Figura 3.1 – Planejamento da série de compostos. Em destaque os locais das modificações estruturais.

3.2 Composto-protótipo

A nifuroxazida é um fármaco pertencente à classe dos nitrofuranos. O primeiro composto desta classe a ser introduzido em terapêutica foi a nitrofurazona, nos anos 40 [1], e, desde então, centenas de compostos derivados do 5-nitrofurano foram sintetizados e

avaliados quanto a atividade antimicrobiana e demonstraram amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e também sobre alguns protozoários [2]. A incidência de efeitos tóxicos atribuídos ao uso destes compostos, aliados com o surgimento de fármacos antimicrobianos mais efetivos, fizeram com que vários nitrofuranos fossem excluídos como opções terapêuticas e hoje em dia, apenas alguns destes compostos são utilizados na prática médica [2]. Entretanto, devido as suas propriedades biológicas, um interesse tem se voltado para esses compostos, visando, principalmente, a identificação de análogos terapeuticamente promissores.

Diversos estudos indicam que o provável mecanismo de ação de nitrocompostos utilizados como antineoplásicos, antiparasitários e antibacterianos, seja decorrente da biorredução enzimática do grupo nitro ($-\text{NO}_2$) [3 – 9]. A passagem transmembrana destas moléculas ocorre por difusão passiva e aumenta à medida que os radicais livres, provenientes do processo de biorredução, desestabilizam a membrana celular [10]. O aumento da concentração intracelular de nitrocompostos, resulta na geração de maiores quantidades de radicais livres, elevando desta forma, os danos causados pelo estresse oxidativo [3, 10], provenientes da interação destas espécies radicalares com biomoléculas de parasitas, fungos e bactérias [9 – 12].

O mecanismo de ação proposto por VIODÉ e colaboradores [9], sugere duas rotas possíveis para bioativação destes nitrocompostos, figura 3.2. O processo se inicia com a redução do grupo nitro gerando o nitro ânion-radical ($\text{NO}_2^{\cdot-}$), em uma reação, envolvendo um elétron, catalisada pela enzima NADPH-citocromo P450 redutase [9].

Figura 3.2 – Via biorredutiva de nitrocompostos.

[Reproduzido a partir de *Biochem Pharmacol*, 57, Viodé, C., Bettache, N., Cenas, N., Krauth-Siegel, R.L., Chavière, G., Balakara, N., Périe, J., Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles, 549–557, Copyright (1999), com permissão de Elsevier.]

Em meio **anaeróbio**, o radical nitroânion é transformado em seu correspondente derivado nitroso ($\text{Ar} - \text{NO}$). Este por sua vez, gera o intermediário hidroxilamino ($\text{Ar} - \text{NHOH}$) e posteriormente, em nova reação de redução, ocorre a geração da espécie reduzida amínica ($\text{Ar} - \text{NH}_2$), em um processo que envolve ao todo a participação de seis elétrons [7,9]. Em meio **aeróbio**, o radical nitroânion reage com oxigênio gerando o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o qual é posteriormente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por meio da reação com a superóxido dismutase (S.O.D.). O peróxido formado reage com enzimas ferredoxinas promovendo a formação de hidroxila radicalar ($\text{OH}^{\bullet}$ e OH^-). Essas espécies se ligam a lipídeos, proteínas e DNA, resultando em danos biológicos [11].

As diferentes capacidades de células de mamíferos, parasitas, bactérias aeróbias e anaeróbias em reduzir os nitrocompostos, influenciam diretamente na seletividade destes compostos [10]. Os intermediários formados durante as etapas de redução do grupo nitro podem contribuir para os efeitos tóxicos. A hidroxilamina ($\text{Ar} - \text{NHOH}$) geralmente é responsável por metemoglobinemia, enquanto que a mutagenicidade e efeitos carcinogênicos provém da combinação do nitro ânion-radical ($\text{NO}_2^{\bullet-}$) ou hidroxilamina ($\text{Ar} - \text{NHOH}$) com macromoléculas celulares. Os efeitos carcinogênicos também podem ser decorrentes do *stress* oxidativo proveniente da reoxidação do nitro ânion-radical ($\text{NO}_2^{\bullet-}$),

que é um mecanismo de detoxificação celular, uma vez que impede a formação das espécies radicalares. Entretanto as espécies reativas de oxigênio geradas por este ciclo, conhecido como ciclo fútil, também são tóxicas para a célula [13].

A capacidade de redução de certos sistemas enzimáticos em microrganismos aeróbios alcança valores de até no máximo $-0,35$ V, enquanto que em microrganismos anaeróbios tais sistemas conseguem reduzir os nitrocompostos em valores próximos a $-0,5$ V [10, 12]. Já em células de mamíferos, as quais geralmente são oxigenadas, o principal sistema enzimático envolvido, NAD^+ ou NADP^+ , apresenta potencial de redução de $-0,32$ V, e em não oxigenadas, situação dos tumores hipóxicos, o potencial de redução não é tão negativo quanto em anaeróbios, mas ainda é mais baixo do que em células aeróbicas saudáveis [14], o que explica o uso de alguns nitrocompostos, principalmente nitroimidazóis, no tratamento de tumores sólidos [10, 14]. Apresenta-se na figura 3.3, a escala de afinidade eletrônica exibida por diferentes classes de nitrocompostos [12].

Figura 3.3 – Faixa de potencial de redução para diferentes classes de nitrocompostos [12].

A correlação proporcionada entre os efeitos benéficos e efeitos tóxicos pelos nitrocompostos é fator limitante para o uso e para o desenvolvimento de novos fármacos envolvendo esta classe química. No caso da nifuroxazida, quanto a sua **toxicidade**, estudos realizados por BLUMESTIEL e colaboradores [15], demonstraram que este fármaco não desencadeia efeitos tóxicos em células de mamíferos em concentrações menores a $10 \mu\text{M}$, e

quanto o seu uso como **agente antimicrobiano**, AVRIL e colaboradores [16], determinaram que a administração oral da nifuroxazida, não condicionava o desenvolvimento de mecanismos de resistência microbiana causada por transferência de plasmídios. Quanto ao aspecto de **desenvolvimento**, a nifuroxazida apresenta características estruturais que propiciam o emprego de métodos de modificação molecular planejada, e diversos análogos foram identificados com ação frente *Staphylococcus aureus* [17, 18], *S.aureus* multirresistentes (MRSA) [19], *Mycobacterium tuberculosis* [20], *T.cruzi* [21] e *Candida albicans* [21].

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

3.3 Definição da Variação Estrutural

3.3.1 Grupo Farmacofórico

A troca do sistema nitrofurânico por benzofuroxânico, figura 3.1, página 65, foi proposta pela semelhança de atividade atribuída ao sistema 5-nitrofurânico [23 – 25], ou seja, o sistema benzofuroxano possui o grupamento ($=N(\rightarrow O)O^-$), o qual partilha semelhanças com grupo nitro e com grupos aromáticos contendo *N-óxidos* ($Ar>N\rightarrow O$). Dessa forma, essa troca é fundamentada na redução enzimática envolvendo um elétron do grupamento benzofuroxano, em um potencial de redução que seja capaz de desencadear uma resposta biológica seletiva.

Os grupos aromáticos que contém a função *N-óxido* em sua estrutura, constituem uma classe importante de compostos biorredutíveis, usados como agentes antitumorais, tais como a tirapazamina (**16**) e seus análogos (figura 3.4), os quais apresentam um potencial de redução na faixa de -0,38V até -0,80V [26, 27].

Figura 3.4 – Estrutura química da tirapazamina. Em destaque o local de variação estrutural dos análogos [27].

ŠARLAUSKAS e colaboradores [28], demonstraram através de estudos eletroquímicos que o potencial de redução de diferentes benzofuroxanos acontecem na faixa fisiológica de $\geq -0,5$ V, similares a nitrobenzenos ($-0,50$ a $-0,20$ V). A redução destes compostos, envolveu um elétron, e o modelo utilizado, sugere que esta redução possa acontecer também, via enzima de mamíferos, tais como NADPH-citocromo P450 redutases, o que poderia implicar em possíveis efeitos citotóxicos destes compostos, mas, assim como é visto para nitrocompostos, esta citotoxicidade vai depender diretamente das estruturas químicas, concentrações usadas e tempo de exposição aos compostos. Quanto aos aspectos químicos e biológicos destes compostos, maiores considerações serão feitas no Capítulo 4.

3.3.2 Grupo Azometínico

Esse grupo foi mantido na série de compostos, uma vez que os compostos nitrofurânicos utilizados na terapêutica atual, nitrofurazona (Furacin®, Mantecorp) (**17**), nitrofurantoína (Macrofantina®, Mantecorp) (**18**), furazolidona (Giarlam®, Uci-Pharma) (**19**) e nifurtimox (Lampit®, Roche) (**20**), apresentam em comum o grupo azometínico ($-\text{CH}=\text{N}-$) ligado ao carbono 2 do anel heterocíclico. O grupo azometínico apresenta propriedade antimicrobiana intrínseca, o que resulta em um sinergismo farmacológico entre este grupo e o sistema 5-nitrofurano [29].

Figura 3.5 – Compostos nitrofurânicos utilizados atualmente na farmacoterapia humana. Em destaque o grupo farmacofórico responsável pela atividade antimicrobiana.

3.3.3 Variações do Anel Benzênico

As opções de variações ficaram restritas ao anel benzênico. Desta forma foram incluídos grupos com propriedades físico-químicas distintas, nas posições *para*, *meta* e *orto* do anel aromático uma vez que variações nestas posições demonstram influenciar na atividade.

Para exemplificar este tipo de variação, cita-se o trabalho realizado por TAVARES e colaboradores [17, 18] os quais observaram que a substituição da hidroxila fenólica da nifuroxazida por grupos retiradores de elétrons favoreceu a atividade antibacteriana frente às cepas de *S.aureus*, e adicionalmente, que a hidrofobicidade é a propriedade físico-química de maior influência na atividade antimicrobiana da série.

3.4 Escolha dos Grupos Substituintes

Para compor a série de derivados benzofuroxânicos, os grupos substituintes foram escolhidos com base no Diagrama de Craig [30], e os parâmetros considerados foram as constantes de hidrofobicidade π de Hansh e de efeito eletrônico σ de Hammett, figura 3.6.

Figura 3.6 – Diagrama de Craig com os substituintes planejados para compor a série de derivados benzofuroxânicos.

[Adaptado a partir de *J Med Chem*, 14, Craig, P.N., Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies, 380-684, Copyright (1971), com permissão de Elsevier.]

O diagrama de Craig foi a primeira contribuição para o delineamento de séries para estudos de QSAR [31, 32]. Em 1971, Craig correlacionou diferentes descritores a fim de estabelecer a dependência ou interdependência entre eles, e determinou que o parâmetro π é estatisticamente independente dos parâmetros eletrônicos σ , $\mathcal{J}$ e $\mathcal{R}$ [30]. Assim, propôs a construção de gráficos de dispersão onde os eixos são formados pelas variáveis independentes, e a escolha adequada dos grupos substituintes deve ser realizada considerando a maior dispersão possível neste gráfico, ou seja, devem ser selecionados os substituintes de maneira a abranger os quatro quadrantes do plano cartesiano, por exemplo, quando π e σ são considerados, selecionam-se os grupos: H (na origem do diagrama), Cl ou Br (retiradores de elétrons com características hidrofóbicas), NO₂ (retirador de elétrons), -NH₂ (doador de elétrons com características polares), N(CH₃)₂ (doador de elétrons com característica hidrofóbica) [31 - 33]. Desta forma, uma vez que o

modelo de QSAR tenha sido gerado para um conjunto inicial de compostos, por exemplo, por aplicação da *Análise de Hansch*, o sinal e a grandeza do coeficiente de regressão dos descritores determinará qual o quadrante específico do diagrama será explorado para direcionar a síntese dos futuros análogos [34].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DODD, M.C., STILLMAN, W.B. The *in vivo* bacteriostatic action of some simple furan derivatives. *J Pharmacol Exp Ther.* 82, 11-18, **1944**.
- [2] KOROLKOVAS, A, FRANÇA, F.F.C. Dicionário Terapêutico Guanabara. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2005**.
- [3] GOIJMAN, S.G., STOPPANI, A.O. Effects of nitroheterocyclic drugs on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Pharmacol.* 34, 1331-1336, **1985**.
- [4] McOSKER, C.C., POLLACK, J.R., ANDERSEN, J.A. Inhibition of bacterial synthesis by nitrofurantoin macrocrystals: an explanation for the continued efficacy of nitrofurantoin. *R Soc Med Int Congr Symp Ser.* 154, 33-44, **1989**.
- [5] DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs, *Chem Biol Interact.* 73, 1-27, **1990**.
- [6] McOSKER, C.C., FITZPATRICK, P.M. Nitrofurantoin: Mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *J Antimicrob Chemother.* 33, suppl A, 23-30, **1994**.
- [7] SQUELLA, J. A., LETELIER, M. E., LINDERMEYER, L., NUNES-VERGARA, L. J. Redox behaviour of nifuroxazide: generation of the one-electron reduction product. *Chem Biol Interact.* 99, 227-238, **1996**.
- [8] TOCHER, J.H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds. *Gen Pharmacol.* 28, 485-487, **1997**.

[9] VIODÉ, C., BETTACHE, N., CENAS, N., KRAUTH-SIEGEL, R.L., CHAUVIÈRE, G., BAKALARA, N., PÉRIÉ, J. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles. *Biochem Pharmacol.* 57, 549–557, **1999**.

[10] PAULA, F.R., SERRANO, S.H.P., TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Quím Nova.* 32, 1013-1020, **2009**.

[11] MAYA, J.D., CASSELS, B.K., ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P., FERREIRA, J., FAÚNDEZ, M., GALANTI, N., FERREIRA, A., MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host, *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol.* 146, 601–620, **2007**.

[12] EDWARDS, D.I. DNA binding and nicking agents. In: HANSCH, C., SAMMES, P.G., eds. *Comprehensive medicinal chemistry*, Pergamon Press:Oxford, v.2, **1990**, p. 725-751.

[13] MACHEREY, A.C., DANSETTE, P.M. Biotransformations leading to toxic metabolites: chemical aspect. In: WERMUTH, C.G., ed. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3.ed. Oxford:Elsevier, **2008**. p. 674 – 696.

[14] MORETH, M., ORNELAS, D., GOMES, C.R.B., DE SOUZA, M.V.N. Nitroimidazóis – uma promissora classe de substâncias para o tratamento da Tuberculose. *Rev Virtual Quim.* 2, 105-117, **2010**.

[15] BLUMESNTIEL, K., SCHÖNECK, R., YARDLEY, V., CROFT, S.L., KRAUFT-SIEGEL, R.L. Nitrofurán drugs as common subversive substrates of *Trypanosoma cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1791-1799, **1999**.

[16] AVRIL, J.L., BRIFFORD, J., BEINIS, J.P., DUBRISAY, J. Etude de l'influence de l'antibiothérapie sur les résistances des entérobactéries de l'intestin. *Ann Microbiol.* 131B, 21-29, **1980**.

[17] TAVARES, L.C., PENNA, T.C.V., AMARAL, A.T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs I. *Boll Quim Farm.* 136, 244 – 249, **1997**.

[18] TAVARES, L.C., CHISTÉ, J.J., SANTOS, M.G.B., PENNA, T.C.V. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs II. *Boll Chim Farm.* 138, 432 – 436. **1999**.

- [19] MASUNARI, A., TAVARES, L.C. A new class of nifuroxazide analogues: synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem.* 15, 4229 – 4236, **2007**.
- [20] RANDO, D.G., SATO, D.N., SIQUEIRA, L., MALVEZZI, A., LEITE, C.Q.F., DO AMARAL, A.T., FERREIRA, E.I. TAVARES, L.C. Potential tuberculostatic agentes. Topliss application on benzoic acid-[(5-nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. *Bioorg Med Chem.* 10, 557-560, **2002**.
- [21] PAULA, F.R., JORGE, S.D., ALMEIDA, L.V., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L.C. Molecular modeling studies and *in vitro* bioactivity evaluation of a set of novel 5-nitro-heterocyclic derivatives as anti-*T. cruzi* agents. *Bioorg Med Chem.* 17, 2673-2679, **2009**.
- [22] SONEHARA, I.Y. Estudo de identificação de possíveis alvos para nitrocompostos azometínicos ou oxadiazolínicos com atividade antifúngica e anti-*T. cruzi*. **2009**. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).
- [23] CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., RISSO, M., SAENZ, P., SEOANE, G., DENICOLA, A., PELUFFO, G., QUIJANO, C., OLEA-AZAR, C. 1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure – Activity Relationships. *J Med Chem.* 42, 1941-1950, **1999**.
- [24] AGUIRRE, G., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., PORCAL, W., SEOANE, G., ORTEGA, M.A., ALDANA, I. MONGE, A., DENICOLA, A. Benzo[1,2,-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Structure-activity relationships. Part 2. *Arch Pharm.* 335, 15-21, **2002**.
- [25] AGUIRRE, G., BOIANI, L., BOIANI, M., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., PORCAL, W., DENICOLA, A., PIRO, O.E., CASTELLANO, E.E., SANT'ANNA, C.M.R., BARREIRO, E.J. Benzo[1,2,-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part 3: Substituents-clustering methodology in the search for new active compounds. *Bioorg Med Chem.* 13, 6324-6335, **2005**.
- [26] PRIYADARSINI, K.I., TRACY, M., WARDMAN, P. The One-Electron Reduction Potential of 3-Amino-1, 2, 4-benzotriazine 1, 4-dioxide (Tirapazamine): A Hypoxia-Selective Bioelectroactive Drug *Free Rad. Res.* 25, 393-399, **1996**.

[27] WARDMAN, P., PRIYADARSINI, K.I., DENNIS, M.F., EVERETT, S.A., NAYLOR, M.A., PATEL, K.B., STRATFORD, I.J., STRATFORD, M.R., TRACY, M. Chemical properties which control selectivity and efficacy of aromatic N-oxide bioreductive drugs. *Br J Cancer Suppl.* 27, S70–S74, **1996**.

[28] ŠARLAUSKAS J., MILIUKIENĖ, V., ANUSEVIČIUS, Ž., MISEVIČIENĖ, L., KRIKŠTOPAITIS, K., NEMEIKAITĖ-ČENIENĖ, A., VITĖNIENĖ, I., ČĖNAS, N. Redox properties and prooxidant cytotoxicity of benzofuroxans: a comparison with nitrobenzenes. *Chemija.* 20, 109-115, **2009**.

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

[30] CRAIG, P.N. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. *J Med Chem*, 14, 680-684, **1971**.

[31] KUBINYI, H. QSAR: Hansch analysis and related approaches. New York:VCR, **1993**.

[32] SELASIE, S.D. History of Quantitative Structure-Activity Relationships. In: ABRAHAM, D.J., ed. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Volume 1, Drug Discovery. 6.ed. New York: Willey-Interscience, **2003**. p. 1 – 49.

[33] TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. *Quím. Nova.* 27, 631 – 639, **2004**.

[34] SILVERMAN, R. B. The Organic Chemistry of Drug Desing and Drug Action. 2.ed. Califórnia: Elsevier Academic Press, **2004**.

Síntese dos compostos

4.1 Introdução

O sistema heterocíclico benzofuroxano (*benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol N-óxido*) (**21**, figura 4.1A) tem atraído a atenção de diversos pesquisadores devido às suas características químicas, além de importantes características biológicas, sendo amplamente revisado em várias ocasiões [1 - 3]. Dentre as atividades biológicas atribuídas a estes compostos são descritas propriedades antifúngicas, antiparasitárias, antiagregantes plaquetárias, antileucêmicas, entre outras [4].

Descobertos no final do século XIX, estes compostos foram obtidos por diferentes rotas sintéticas (figura 4.1A), apesar da estrutura química ser atribuída de diferentes maneiras ao longo dos anos (figura 4.1B). A primeira delas foi um derivado *orto*-dinitroso (**22**), em seguida um peróxido (**23**), e finalmente 1912, a estrutura correta foi dada por GREEN e ROWE [5, 6], ligeiramente diferente da estrutura atualmente descrita (**21**). Entretanto, estes mesmos pesquisadores, ao tentarem provar a natureza assimétrica desses compostos, obtiveram o mesmo produto da reação de oxidação do 3-amino-4-nitrotolueno e seu isômero 4-amino-3-nitrotolueno com hipoclorito de sódio [1]. A partir desse fato, novas estruturas foram sugeridas, incluindo uma estrutura tricíclica (**24**) e um híbrido de ressonância (**25**), proposto com o nome de ψ -o-dinitrosobenzeno em 1955 por BOYER e colaboradores [5, 7].

Figura 4.1 – (A) esquema de síntese do composto benzofuroxano. (B) estruturas sugeridas para o composto benzofuroxano.

A primeira explicação para este dilema foi sugerida por HAMMICK e colaboradores [8], que compararam o efeito da bromação de benzofuroxano e de benzofurazan, considerando as propriedades físicas em relação ao tamanho molecular através do número de “*parachor*”. Estes pesquisadores identificaram a presença de dois isômeros e, apesar de não os isolarem, sugeriram uma rápida interconversão dos isômeros, na qual o sistema benzofuroxano se reorganiza entre as duas estruturas bicíclicas assimétricas através da formação de anel dinitroso, figura 4.2, sugerindo assim, que a provável estrutura desse composto fosse **21** ao invés de **22**, **23**, e **24**.

Figura 4.2 – Reestruturação molecular de benzofuroxanos.

Esse postulado foi mais tarde provado conclusivamente por métodos experimentais, investigando o comportamento químico destes compostos por espectroscopia de RMN ^1H , ^{13}C , ^{14}N e ^{17}O [9 - 12], e por métodos teóricos [13,14], os quais demonstraram consistência com o mecanismo proposto acima. A prova definitiva de que o tautomerismo ocorre via *o*-dinitrosobenzênio, foi descrita em 1991 em experimentos de espectroscopia de infravermelho e UV/visível [15]. A partir da fotólise do benzofuroxano e *o*-nitrofenil azida, DUNKIN e colaboradores identificaram o intermediário em matrizes de argônio, caracterizados por uma banda intensa de absorção em 1515 cm^{-1} , característica de compostos nitrosos [15].

Em temperatura ambiente, os estudos de RMN demonstram que os derivados benzofuroxânicos existem como mistura de tautômeros, embora normalmente apenas um isômero seja identificado quando há um grupo substituinte na posição 4, ao invés de haver um equilíbrio com a posição 7 [16]. Entretanto, para as outras duas posições, o benzo-substituinte pode ocupar a posição 5 ou 6 e a proporção de ambos os tautômeros neste equilíbrio dependerá de uma série de fatores, como solvente, temperatura e natureza dos substituintes no anel [3, 17]. Mediante as mesmas condições (solvente e temperatura), a

presença de grupos retiradores de elétrons geralmente favorece o tautômero 6-substituído, enquanto que a presença de grupos doadores de elétrons favorece o tautômero 5-substituído [11, 17].

Um amplo espectro de propriedades biológicas tem sido relatado para compostos contendo benzofuroxanos, principalmente pela sua capacidade de liberar moléculas de óxido nítrico (NO, *nitric oxide*) em condições fisiológicas [18]. O NO é um importante mensageiro implicado na regulação de processos biológicos com numerosos efeitos fisiológicos e patológicos [3]. O NO participa como mediador citotóxico de células efectoras ativadas do sistema imunológico, capaz de destruir patógenos e células tumorais [19]. Esta propriedade foi explorada e demonstrou-se a capacidade de derivados benzofuroxânicos de inibirem *in vitro* a síntese de RNA em linfócitos de carneiro, de acordo com GHOSH e WHITEHOUSE [17,20] .

Outra propriedade do NO é participar diretamente em vários processos na homeostase vascular, como por exemplo, no relaxamento vascular e na inibição da agregação plaquetária [19, 21]. O primeiro relato de estudos a respeito da propriedade vasodilatadora de derivados benzofuroxânicos, foi feito por GHOSH e EVERITT [22] em 1974. O composto benzodifuroxano (**26**) foi identificado como potente vasodilatador, e sua atividade biológica foi atribuída à similaridades estruturais com a molécula de nitroglicerina (TNG, trinitroglicerina, **27**). Os autores sugeriram que a melhoria na atividade do composto **26** em relação à TNG devia-se ao arranjo planar ou quase planar dos centros iônicos **26'**, figura 4.3. MEDANA e colaboradores [23], em 1999, demonstraram que a liberação de NO está envolvida na ação vasodilatadora do composto **26**, o qual demonstrou ser duas vezes mais potente do que o nitroprussiato, usado como referência.

Figura 4.3 – Comparação da estrutura molecular do benzodifuroxano **26** com a estrutura da trinitroglicerina **27**. Em destaque na estrutura **26'** os centros iônicos.

Em 2000, BUSSYGINA e colaboradores [24] demonstraram que o composto benzodifuroxano **26**, é dez vezes mais potente que o nitroprussiato, atuando como inibidor da agregação plaquetária induzida por ADP.

A capacidade de liberar moléculas de NO também é explorada na formação de compostos híbridos [3], como por exemplo, com anti-inflamatórios não-esteróides (NO-AINES) [25]. Resumidamente, os anti-inflamatórios não-esteróides (AINES) atuam na inibição da atividade das ciclooxigenase-1 (COX-1; constitucional ou fisiológica) e ciclooxigenase-2 (COX-2; induzida no processo de inflamação), assim, inibem a síntese de prostaglandinas e tromboxano, mediadores importantes da dor e da agregação plaquetária, respectivamente [26]. Os efeitos benéficos provenientes de AINES que atuam inibindo a COX-1 são equilibrados com os efeitos colaterais, principalmente pela intolerância gastrointestinal, uma vez que as COX-1 auxiliam na manutenção da integridade da mucosa gastroduodenal, homeostase vascular, agregação plaquetária e modulação do fluxo plasmático renal [27]. Nos últimos anos, uma série de novas abordagens tem sido utilizadas para desenvolver AINES que não desencadeassem tal efeito colateral. Uma delas foi a criação de inibidores seletivos da COX-2. A COX-2 é uma enzima indutível, geralmente indetectável na maioria dos tecidos, sua expressão é aumentada em processos inflamatórios [27]. Estes inibidores seletivos demonstram uma capacidade reduzida de induzir a ulceração gástrica, no entanto, alguns estudos clínicos evidenciaram uma ocorrência elevada de eventos cardiovasculares e tromboembólicos em usuários crônicos da medicação, sendo que alguns, rofecoxib (Vioxx®, Merck) e valdecoxibe (Bextra®, Pfizer), foram retirados do mercado [27].

O óxido nítrico (NO) pode ter um papel intermediário na citoproteção da mucosa gástrica. O NO liberado por estes AINES, exerce efeitos benéficos sobre a mucosa gástrica, modulando as funções tais como o fluxo sanguíneo da mucosa e, consequentemente, a produção de muco [25]. A vantagem dessa abordagem é a manutenção da atividade original AINES clássicos com redução dos efeitos colaterais gástricos. Em estudos recentes, CARVALHO e colaboradores [28] sintetizaram um composto híbrido (**29**) a partir do diclofenaco e do sistema benzofuroxano, figura 4.4, o qual manteve a atividade anti-inflamatória semelhante ao composto original (diclofenaco sódico, usado como referência,

28), entretanto sem observar as propriedades ulcerogênicas pertinentes ao fármaco original.

Figura 4.4 –Estrutura química do diclofenaco sódico **28** e do diclofenaco híbrido com benzofuroxano **29** [28].

Em 1999, CERECETTO e colaboradores [29], investigaram a capacidade biorredutível de derivados benzofuroxânicos, na busca por compostos com atividade anti-*T. cruzi*, uma vez que esta bioatividade, assemelha-se à desencadeada por nitrocompostos usados como antimicrobianos e tem como mecanismo de ação, a geração de radicais livres tóxicos a bactérias e parasitas. Os compostos que demonstraram uma melhor atividade foram os compostos **30** e **31**, figura 4.5, com inibição de crescimento de 90% e 75% sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*. A atividade destes compostos foi comparada com o nifurtimox (NFX, fármaco utilizado como referência, **20**) em concentrações de 25 μ M.

Figura 4.5 –Estrutura química dos compostos **30**, **31** e nifurtimox **20** [29].

Neste mesmo estudo, além de outras importantes considerações, os autores comprovaram que a ausência da porção *N*-óxido acarretava perda da atividade, indicando

assim, a participação direta deste grupo sobre a bioatividade frente ao protozoário [29]. A partir desses resultados, a busca por novos agentes anti-*T. cruzi* impulsionou o número de pesquisas envolvendo estruturas heterocíclicas contendo a função *N*-óxido, tais como benzimidazóis [30, 31], indazóis [32] quinoxalinas [33] e benzofuroxanos [34 – 37], dos quais vários protótipos foram encontrados como promissores, além de terem sido submetidos a mais estudos, tais como citotoxicidade e atividade *in vivo*. Dentre os derivados benzofuroxânicos que estão em estágio avançado de pesquisa, citam-se os compostos **32** – **40** [38], figura 4.6.

Figura 4.6 –Estruturas química dos compostos **32** – **40** e benzimidazol **41** [38].

Os compostos **32** – **34** (sob mistura de isômeros) foram desenvolvidos como inibidores da enzima cruzipaina de *T. cruzi*, e avaliados em um modelo agudo da doença de Chagas [39]. A mistura de isômeros **33** demonstrou o melhor perfil *in vivo* dentre os três compostos testados e do benzimidazol (BZN, fármaco utilizado como referência, **41**). Além disso, nenhum sinal de toxicidade foi observada nos animais estudados, durante o tratamento, e nenhum dos animais tratados morreu, enquanto no grupo controle a taxa de sobrevivência foi de 75% [39].

Os compostos **35** – **40**, foram estudados *in vivo* contra diferentes cepas de *T. cruzi*, Tulahuen 2 e Colombiana (resistente à NFX e BZN), e duas cepas selvagens [40]. Os

resultados mostraram que o composto **35** e a mistura equimolecular **35:36** foram capazes de reduzir a carga parasitária dos animais com infecções plenamente estabelecida com o *T. cruzi*. Além disso, os resultados obtidos no estudo de toxicidade aguda, demonstraram que o composto **35**, em altas doses, não produziu danos notáveis sobre os animais [40].

Dessa forma, essa breve abordagem permitiu identificar algumas características químicas e biológicas dos derivados benzofuroxânicos, demonstrando assim o forte potencial destes compostos no desenvolvimento de novos ligantes.

4.2 Objetivos

- i) Sintetizar e identificar os compostos planejados;
- ii) Explorar caminhos sintéticos alternativos para sintetizar os intermediários benzidrazídicos em etapa sintética única;
- iii) Avaliar diferentes caminhos sintéticos descritos em literatura para a obtenção do aldeído 5-formilbenzofuroxano.

4.3 Materiais e Métodos

Os compostos planejados para este trabalho foram obtidos em três etapas segundo esquema apresentado na figura 4.7. A primeira etapa é a obtenção de benzidrazidas mono e dissustituídas **3a – t** a partir de seus respectivos ácidos benzóicos **1a – t**. Para esta etapa, foram utilizados dois caminhos sintéticos. O primeiro caminho sintético utilizado consiste em uma reação de esterificação dos ácidos benzóicos **1a – t** para gerar seus respectivos ésteres **2a – t**, seguido de uma reação de amonólise para a obtenção das benzidrazidas **3a – t**. O segundo caminho sintético utilizado neste estudo visa a otimização do caminho sintético descrito anteriormente, e que, consiste na preparação das benzidrazidas **3a – t** em apenas uma etapa sintética.

Figura 4.7 – Síntese dos derivados benzofuroxanos.

A segunda etapa visa a síntese do aldeído intermediário, 5-formilbenzofuroxano **6**, realizada a partir da reação de substituição nucleofílica aromática, entre 4-cloro-3-nitrobenzaldeído **4** e o sal azida de sódio, seguido de uma reação que consiste em pirólise da *orto*-nitrofenil azida **5**. Nesta etapa, também foi utilizado um caminho sintético alternativo, apenas com o intuito de averiguar qual caminho sintético seria mais viável. Neste caminho, o aldeído intermediário **6** foi obtido a partir do composto 4-cloro-3-

nitrobenzaldeído **4** em uma etapa sintética por meio de uma substituição do grupo cloro pelo grupo azido seguido de uma ciclização *in situ* sob condições de catálise de transferência de fase.

A terceira etapa foi a síntese dos derivados benzofuroxânicos **7a – t**. Esta etapa consiste em adição nucleofílica de um composto carbonílico, 5-formilbenzofuroxano **6**, com uma amina, benzidrazidas mono e dissustituídas **3a – t**.

A estrutura química dos compostos sintetizados foi comprovada utilizando-se espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) e os espectros estão descritos no Anexo 1, “Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos sintetizados”. A determinação da faixa de fusão e a análise elementar foram utilizadas como critério de pureza dos compostos obtidos.

4.3.1 Obtenção das benzidrazidas – 1ª etapa

A síntese das benzidrazidas mono e dissustituídas **3a – t** foi realizada através de dois caminhos sintéticos, ilustrados na figura 4.8. O primeiro caminho utilizado – *caminho sintético A* – consiste na esterificação de ácidos benzóicos **1a – t**, seguido de uma amonólise dos ésteres obtidos previamente **2a – t**. O segundo caminho – *caminho sintético B* – consiste na obtenção direta das benzidrazidas **3a – t** a partir dos ácidos benzóicos **1a – t**.

Figura 4.8 – Caminhos sintéticos utilizados na obtenção de benzidrazidas.

Síntese em duas etapas – Caminho sintético A

No primeiro caminho sintético utilizado (figura 4.9), os ácidos benzóicos¹ **1a - t** (0,04 mol) foram dissolvidos em metanol² anidro em excesso (1:50; 50,0 mL). Adicionou-se pequeno volume de ácido sulfúrico³ (1,0 mL, 2,0 mmol) para agir como catalisador. Este sistema foi mantido sob refluxo por quatro horas. Foi concentrado sob pressão reduzida o volume de metanol obtendo-se os ésteres desejados **2a - t** por resfriamento, que foi posteriormente filtrado, lavado com água destilada e seco em presença de pentóxido de fósforo⁴.

Para a obtenção dos ésteres 4-aminobenzoato de metila **2c** e 4-dimetilaminobenzoato de metila **2k** foi necessário adicionar alguns procedimentos na metodologia. Após as quatro horas de refluxo a solução foi transferida para um béquer e basificada até pH 9,0 – 10,0 com carbonato de sódio⁵ 10%. A solução foi filtrada e extraída com éter etílico⁶. Foi adicionado sulfato de magnésio anidro⁷ na fase orgânica e na sequência foi realizada a filtração deste sistema. Concentrou-se sob pressão reduzida o volume de metanol e éter etílico até obtenção de óleo. A cristalização foi feita de etanol/água. Os ésteres obtidos foram filtrados, lavados com água destilada gelada e secos em presença de pentóxido de fósforo.

Síntese dos benzoatos de metila *Síntese das benzidrazidas*

Figura 4.9 – Síntese das benzidrazidas em duas etapas sintéticas.

¹ Ácidos benzóicos substituídos 99% - Sigma-Aldrich Corporation;

² Álcool metílico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

³ Ácido sulfúrico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

⁴ Pentóxido de fósforo - Fluka and Riedel-de Haën Company;

⁵ Carbonato de sódio - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

⁶ Éter etílico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

⁷ Sulfato de magnésio seco - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

Hidrato de hidrazina⁸ 64% v/v (30,0 mL) foi aquecido até 50-60 °C sob agitação magnética e em seguida o benzoato de metila **2a - t** (0,01 mol) foi adicionado em pequenas porções. A temperatura foi elevada até atingir refluxo e mantido sob essa condição por dez minutos. Por conseguinte, resfriou-se o sistema em banhos sucessivos de água, gelo e gelo seco com etanol⁹ para cristalizar o produto desejado **3a - t**. A benzidrazida precipitada foi filtrada e seca em presença de pentóxido de fósforo.

Para a obtenção das benzidrazidas 4-nitro substituída **2m** e 3-trifluoro-4-nitro dissustituída **2t** as reações foram realizadas em banho de gelo durante o período de uma hora.

Síntese em uma etapa – Caminho sintético B

O segundo caminho sintético utilizado neste estudo (figura 4.10) assemelha-se ao primeiro, entretanto não existe a necessidade de se isolar o éster **2a - t**. Neste caminho, os ácidos benzóicos **1a - t** (0,01 mol) foram dissolvidos em metanol anidro em excesso (1:50; 20,0 mL). Adicionou-se quantidades catalíticas de ácido sulfúrico (0,5 mL, 1,0 mmol). Este sistema foi mantido sob refluxo por quatro horas. Após este período a solução foi resfriada até temperatura ambiente e em seguida foi adicionado neste sistema hidrato de hidrazina 80% v/v (10,0 mL). A solução foi mantida sob agitação durante trinta minutos. Após este período, quando necessário, resfriou-se o sistema em banhos sucessivos de água, gelo e gelo seco com etanol para cristalizar o produto desejado **3a - t**. A benzidrazida precipitada foi filtrada e seca em presença de pentóxido de fósforo.

Figura 4.10 – Síntese das benzidrazidas em uma etapa sintética.

⁸ Hidrato de hidrazina 80% - Merck Chemicals;

⁹ Álcool etílico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

4.3.2 Obtenção do 5-formilbenzofuroxano – 2ª etapa

O aldeído 5-formilbenzofuroxano **6** também teve a sua síntese realizada em duas etapas sintéticas distintas, ambas descritas em literatura e aplicadas neste estudo com o objetivo de avaliar qual caminho sintético seria mais viável (figura 4.11). O primeiro caminho utilizado – *caminho sintético A* [17] – consiste na substituição nucleofílica do haleto de arila **4**, seguido da ciclocondensação da *orto*-nitrofenil azida obtida previamente **5**. O segundo caminho – *caminho sintético B* [41] – consiste na obtenção direta do composto 5-formilbenzofuroxano **6** a partir do haleto de arila **4**.

Figura 4.11 – Caminhos sintéticos utilizados na síntese do aldeído 5-formilbenzofuroxano.

Síntese em duas etapas – Caminho sintético A

Para o primeiro caminho sintético (figura 4.12), 4-cloro-3-nitrobenzaldeído¹⁰ **4** (0,021 mol) e azida de sódio¹¹ (0,015 mol) foram adicionados em dimetilsulfóxido¹² (30,0 mL). Esta mistura foi aquecida até 75 °C e mantida sob agitação magnética por trinta minutos. Após este período, o sistema foi resfriado e adicionou-se água destilada, seguido de extrações com éter etílico. Adicionou-se sulfato de magnésio anidro. O sistema foi filtrado e o éter evaporado até obtenção de um óleo. A cristalização foi feita em etanol/água.

¹⁰ 4-cloro-3-nitrobenzaldeído 98% - Sigma-Aldrich Corporation;

¹¹ Azida de sódio - Fluka and Riedel-de Haën Company;

¹² Dimetilsulfóxido PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

O aldeído obtido **5** foi filtrado, lavado com água destilada e seco em presença de pentóxido de fósforo.

Após seco e identificado, 4-azido-3-nitrobenzaldeído **5** (0,005 mol) foi colocado sob refluxo em tolueno¹³ (15,0 mL) por trinta minutos. O tolueno foi evaporado e o óleo obtido redissolvido em acetato de etila¹⁴ (5,0 mL). Adicionou-se éter de petróleo¹⁵ (20,0 mL) e a solução foi resfriada. A cristalização foi feita em etanol/água. O aldeído obtido **6** foi filtrado, lavado com água destilada e seco em presença de pentóxido de fósforo.

Figura 4.12 – Síntese do aldeído 5-formilbenzofuroxano em duas etapas sintéticas.

Síntese em uma etapa – Caminho sintético B

No segundo caminho sintético (figura 4.13), 4-cloro-3-nitrobenzaldeído **4** (0,01 mol) e azida de sódio (0,01 mol) foram adicionados em solução a 25°C de brometo de benziltributilamônio¹⁶ (1 mmol) em 1,2-dicloroetano¹⁷ (50,0 mL). Esta mistura foi aquecida lentamente até 60°C e mantida nesta temperatura por seis horas. Após este período, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada. Foi adicionado ao filtrado solução 1N de ácido clorídrico¹⁸ (100,0 mL) e na sequência foi adicionado água (50,0 mL). A fase orgânica foi isolada e adicionou-se a mesma sulfato de magnésio anidro. Por rotaevaporação, a solução foi concentrada e o óleo obtido foi cristalizado em etanol/água para a obtenção do aldeído **6**.

¹³ Tolueno PA- Nuclear;

¹⁴ Acetato de etila PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

¹⁵ Éter de petróleo PA ($30^\circ - 70^\circ\text{C}$) - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

¹⁶ brometo de benziltributilamônio 99%- Sigma-Aldrich Corporation;

¹⁷ 1,2 dicloroetano PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

¹⁸ Ácido clorídrico PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

Figura 4.13 – Síntese do aldeído 5-formilbenzofuroxano em uma etapa sintética.

4.3.3 Obtenção dos derivados benzofuroxânicos – 3ª etapa

Os compostos planejados **7a – t** foram obtidos a partir da reação entre uma amina **3a – t** e um composto carbonílico **6** (figura 4.14). Adicionou-se 5-formilbenzofuroxano **6** (0,01 mol) sobre mistura de água, ácido sulfúrico, ácido acético¹⁹ e metanol (8:7:8:20 v/v) [42, 43]. Aqueceu-se o meio reacional até que todo o aldeído estivesse diluído em solução. A benzidrazida substituída **3a – t** (0,01 mol) foi adicionada lentamente, sob agitação magnética constante. Observou-se a formação de sólido amorfo **7a – t**, que depois de filtrado foi lavado com água destilada e recristalizado em dimetilformamida²⁰/água.

Figura 4.14 – Reação de obtenção dos derivados benzofuroxânicos.

4.3.4 Análises Físico-Químicas

As identificações dos benzoatos de metila substituídos **2a – t**, suas respectivas benzidrazidas **3a – t** e do aldeído 4-azido-3-nitrobenzaldeído **5** foram realizadas mediante

¹⁹ Ácido acético (Glacial) PA- Labsynth Produtos Químicos para Laboratório;

²⁰ *N,N*-dimetilformamida PA - Labsynth Produtos Químicos para Laboratório.

comparação da faixa de fusão experimental com a descrita em literatura. As faixas de fusão foram realizadas em lâminulas de vidro, utilizando-se aparelho digital de marca Micro-química modelo MQAPF-301.

A identificação do aldeído 5-formilbenzofuroxano **6** e dos compostos finais **7a – t** foi realizada por análise espectrométrica de RMN ^1H e RMN ^{13}C e o grau de pureza dos compostos foi avaliado por determinação de faixa de fusão e por análise da composição centesimal. Os espectros de RMN foram realizados em espectrômetro Bruker, modelo Advance DPX-300 MHz, no *Laboratório de Análise Instrumental/FCF/USP*. Utilizou-se dimetilsulfóxido- d_6 ²¹ como solvente e tetrametilsilano como padrão de referência interna. A análise elementar foi realizada em analisador CHN modelo Elementar Analyser 24013 CHN, Perkin-Elmer, na *Central Analítica/IQ/USP*.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Obtenção das benzidrazidas – 1ª etapa

As benzidrazidas utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir da esterificação de ácidos benzóicos, seguido de uma amonólise dos ésteres obtidos previamente. Cita-se que para o intermediário 4-sulfamoilbenzidrazida **3p**, não encontram-se os dados referentes a sua obtenção assim como a obtenção de seu éster precursor **2p**, pois esta benzidrazida foi previamente sintetizada e identificada pelo grupo de pesquisa do *Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos – FBT/FCF – USP* [44], e encontrava-se disponível em quantidade suficiente para a posterior síntese do composto 4-sulfamoil [*N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida **7p**. Não houve também a necessidade de síntese do intermediário 4-hidroxibenzidrazida²² **3d** pois este foi obtido comercialmente.

²¹ Dimetilsulfóxido- d_6 99,5% - Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

²² 4-hidroxibenzidrazida 97%- Sigma-Aldrich Corporation;

A obtenção dos benzoatos de metila consistiu em reação de esterificação de Fischer [45, 46], figura 4.15, dos ácidos benzóicos substituídos com metanol anidro em excesso, catalisada por ácido sulfúrico.

Figura 4.15 – Mecanismo de esterificação de Fischer.

O ácido carboxílico **1** sofre protonação em seu oxigênio carbonílico. A doação de um próton nesta etapa provém do íon metiloxônio **(a)** formado pela transferência de um próton do catalisador ácido para o álcool. A protonação do ácido carboxílico **1.1** aumenta o caráter positivo de sua carbonila, o que favorece com que a molécula de álcool **(b)** atue como um nucleófilo e ataque o carbono carbonílico. O íon alquiloxonio formado pelo ataque nucleofílico **1.2** perde um próton gerando um intermediário tetraédrico neutro **1.3**. Em seguida, o intermediário **1.3** sofre a protonação no oxigênio de um de seus grupos hidroxilas **1.4**. Em seguida, o intermediário **1.4** perde uma molécula de água gerando a

forma protonada do éster **1.5**. A deprotonação da última espécie gerada **1.5** leva a forma neutra do benzoato de metila **2** [45].

Esta reação é reversível e o ácido catalisa tanto a reação direta, esterificação, bem como a reação inversa, que consiste na hidrólise do éster. Assim quando o equilíbrio é atingido, permanece no meio uma considerável quantidade dos reagentes [47]. Para deslocar o equilíbrio no sentido da formação dos produtos pode-se remover um dos produtos ou utilizar excesso de um dos reagentes [48]. Levando-se em consideração estas condições, optou-se pela utilização de excesso de metanol, por ser mais barato e de fácil remoção.

Os benzoatos de metila foram identificados por meio de análise da faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados da literatura (*Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie*). Os dados referentes a esta etapa sintética estão descritas na tabela 4.1. O rendimento médio obtido ficou em torno de 85%, com variações de rendimento entre 81% e 96%. Apenas o éster 2,4-diclorobenzoato de metila **2r** não foi obtido devido a problemas relacionados em seu isolamento. Novas tentativas em sua síntese com mudanças na metodologia não foram realizadas a fim de evitar o consumo desnecessário de material de partida **1r**, uma vez que a síntese do composto 2,4-diclorobenzidrazida **3r** foi realizado com êxito em uma etapa.

Nesta etapa foi sintetizado o intermediário 4-nitro-3-trifluorobenzoato de metila **2t**. Como trata-se de um composto inédito teve a sua identificação por análise espectrométrica de RMN ^1H e RMN ^{13}C e o grau de pureza determinado por análise da composição centesimal:

4-nitro-3-trifluorobenzoato de metila (2t): RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 8,46 – 8,41 (m, 1H, H6), 8,35 (s, 1H, H2), 8,31 – 8,25 (m, 1H, H5), 3,96 (s, 3H, CH₃); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): 164,9 (C=O), 149,9 (C4), 135,5 (C1), 134,1 (C6), 128,7 (C2), 126,5 (C5), 122,3 (C3), 121,8 (CF₃), 53,5 (CH₃); Anal. Elem. (C₉H₆F₃NO₄): C, 43,39%; H, 2,43%; N, 5,62%. Experimental: C, 43,26%; H, 2,48%; N, 5,59%.

Tabela 4.1 – Dados experimentais obtidos na síntese dos benzoatos de metila.

	R ₁	R ₂	R ₃	rendimento (%)		faixa de fusão (°C)	
				exp.	lit.	exp.	lit. ^a
2a	H	H	H	89	80 ^b	-g	198 – 199 ^h
2b	CH ₃	H	H	87	83 ^b	35,0 – 37,0	32 – 35
2c	NH ₂	H	H	91	73 ^b	86,0 – 90,0	110 – 113
2d	OH	H	H	-	-	-	125 – 128
2e	F	H	H	85	76 ^c	-g	90-92 ^h
2f	CN	H	H	91	90 ^d	65,0 – 67,0	65 – 67
2g	CH ₂ CH ₃	H	H	87	90 ^e	-g	127 – 130 ^h
2h	OCH ₃	H	H	84	81 ^b	48,0 – 49,0	48 – 52
2i	Cl	H	H	96	82 ^b	42,0 – 42,0	42 – 44
2j	COCH ₃	H	H	87	97 ^b	88,0 – 90,0	93 – 96
2k	N(CH ₃) ₂	H	H	92	96 ^b	94,0 – 96,0	100 – 102
2l	OCH ₂ CH ₃	H	H	89	86 ^b	35,0 – 37,0	37 – 38
2m	NO ₂	H	H	96	98 ^b	92,0 – 93,0	94 – 96
2n	CF ₃	H	H	81	80 ^b	-g	94 – 95 ^h
2o	Br	H	H	98	78 ^b	74,0 – 75,0	77 – 81
2p	SO ₂ NH ₂	H	H	-	86 ^b	-	181 – 182
2q	I	H	H	95	60 ^f	112,0 – 113,0	112 – 116
2r	Cl	H	Cl	-	-	-g	166 – 170 ^h
2s	Cl	Cl	H	88	94 ^f	45,0 – 46,0	45 – 47
2t	NO ₂	CF ₃	H	89	-	68,0 – 69,0	-
rendimento médio				85			

a: Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie;

b: [49];

c: [50];

d:[51];

e:[52];

f:[53];

g: ésteres obtidos na forma líquida

h: faixa de ebulição

A obtenção das benzidrazidas planejadas consistiu em reação de amonólise [45 – 47], figura 4.16, dos benzoatos de metila substituídos com hidrato de hidrazina. A reação entre amina **(a)** e ésteres **2** acontece por meio de reação de substituição nucleofílica em carbono acílico – também conhecida como substituição nucleofílica por adição-eliminação – onde um intermediário tetraédrico **2.2** é formado em um primeiro estágio e dissociado em um segundo estágio para a formação de amidas **3**. Nesta reação, o carbono carbonílico, deficiente em elétrons, sofre ataque nucleofílico da hidrazina, resultando na eliminação do grupo alcoxila ($-\text{OCH}_3$) [47].

Formação do intermediário tetraédrico

Dissociação do intermediário tetraédrico

Figura 4.16 – Mecanismo de reação de amonólise de ésteres.

Para a obtenção da 4-nitrobenzidrazida **2m** e 3-trifluoro-4-nitrobenzidrazida **2t** foi necessário modificar a metodologia. Hidrato de hidrazina atua como agente redutor e é amplamente utilizado na redução de grupos nitro aromáticos [54]. Esta redução é favorecida com o uso de catalisadores tais como, ferro metálico, hidróxido de ferro III, grafite, entre outros [55, 56]. Entretanto, apesar do tempo de reação utilizado nesta etapa ser de apenas quinze minutos e de não haver nenhum catalisador presente na reação, a redução do grupo nitro aromático a amino aromático ocorreu em ambos os compostos. Este fato foi comprovado por análise espectrométrica de RMN ^1H (figura 4.17), considerando os desvios químicos (δ) relativo ao padrão interno de referência (tetrametilsilano), onde foi

observado o aparecimento de um singlete com integração de dois prótons nas regiões δ 5,3 ppm (**2m**) e δ 6,0 ppm (**2t**), indicando a presença de grupo NH_2 em posição *para* do anel aromático [57]. A alternativa encontrada para evitar a redução dos compostos foi realizar as reações em banho de gelo durante uma hora.

Figura 4.17 – Espectro de RMN ^1H dos produtos obtidos nas duas condições utilizadas na amonólise do éster 4-nitrobenzoato de metila.

As benzidrazidas foram identificadas por meio de análise da faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados da literatura (*Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie*). Os dados referentes a esta etapa sintética estão descritos na tabela 4.2. Na tabela 4.2 consta apenas o valor experimental da faixa de fusão do intermediário *4-sulfamoilbenzidrazida* **3p**, pois apesar de identificado previamente, optou-se neste trabalho em fazer a recristalização deste composto em etanol, antes de utilizá-lo na síntese final, uma vez que as impurezas poderiam interferir no rendimento final. O rendimento médio obtido na amonólise dos ésteres ficou em torno de 74%, com variações de rendimento entre 51% e 90%..

O baixo rendimento obtido nesta etapa para alguns compostos decorreu provavelmente, da dificuldade de formação dos cristais de benzidrazida, assim como da alta solubilidade em água destes análogos, caracterizando ser esta a etapa limitante, comprometendo, desta forma, no rendimento global dos compostos.

Nesta etapa foi sintetizado o intermediário 4-nitro-3-trifluorobenzidrazida **3t** e por ser um composto inédito teve a sua identificação por análise espectroscópica de RMN ^1H e RMN ^{13}C e o grau de pureza determinado por análise da composição centesimal:

4-nitro-3-trifluorobenzidrazida (3t): RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 10,25 (s, 1H, NH), 8,33 (s, 1H, H2), 8,30 (d, 1H, $J_{(6,5)} = 8.3\text{Hz}$, H6), 8,21 (d, 1H, $J_{(5,6)} = 8.3\text{Hz}$, H5), 4,66 (s, 2H, NH $_2$); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 162,8 (C=O), 148,8 (C4), 137,7 (C1), 133,3 (C6), 127,0 (C2), 126,2 (C5), 122,1 (C3), 121,7 (CF $_3$); Anal. Elem. (C $_8$ H $_6$ F $_3$ N $_3$ O $_3$): C, 38,57%; H, 2,43%; N, 16,87%. Experimental: C, 38,67%; H, 2,30%; N, 16,87%.

Tabela 4.2 – Dados experimentais obtidos na síntese das benzidrazidas.

	R ₁	R ₂	R ₃	rendimento (%)		faixa de fusão (°C)	
				exp.	lit.	exp.	lit. ^a
3a	H	H	H	67	56 ^d	111,0 – 113,0	112 – 114
3b	CH ₃	H	H	80	56 ^d	113,0 – 116,0	116 – 118
3c	NH ₂	H	H	79	83 ^d	227,0 – 228,0	225 – 227
3d	OH ^b	H	H	-	-	-	264 – 266
3e	F	H	H	65	47 ^e	161,0 – 163,0	162 – 166
3f	CN	H	H	63	90 ^f	195,0 – 197,0	195 – 197
3g	CH ₂ CH ₃	H	H	80	75 ^g	119,0 – 120,0	121 – 123
3h	OCH ₃	H	H	61	53 ^d	134,0 – 136,0	136 – 140
3i	Cl	H	H	88	68 ^d	162,0 – 164,0	162 – 165
3j	COCH ₃	H	H	70	75 ^d	180,0 – 181,0	178 – 179 ^d
3k	N(CH ₃) ₂	H	H	88	56 ^d	171,0 – 172,0	169 – 171
3l	OCH ₂ CH ₃	H	H	85	93 ^d	125,0 – 127,0	126 – 128
3m	NO ₂	H	H	51	64 ^d	215,0 – 217,0	217 – 219
3n	CF ₃	H	H	59	65 ^d	115,0 – 116,0	115 – 119
3o	Br	H	H	82	85 ^d	162,0 – 163,0	165 – 167
3p	SO ₂ NH ₂ ^c	H	H	-	-	229,0 – 230,0	226 – 228 ^c
3q	I	H	H	78	86 ^h	163,0 – 165,0	168 – 169
3r	Cl	H	Cl	-	-	-	158 – 161
3s	Cl	Cl	H	90	93 ^h	166,0 – 167,0	167 – 168
3t	NO ₂	CF ₃	H	66	-	166,0 – 167,0	-
rendimento médio				74			

a: Beilstein's Handbuch der Organischen Chemie;

e:[50];

b: disponível comercialmente, Sigma-Aldrich Corporation;

f:[51];

c: [44];

g:[52];

d: [49];

h:[53];

Uma alternativa encontrada para melhorar os rendimentos obtidos nesta etapa, foi a obtenção das benzidrazidas em apenas uma etapa sintética (figura 4.10, página 89) – *Caminho sintético B*. Segundo dados de literatura, um dos fatores que podem facilitar a reação de amonólise seria dissolver os ésteres em etanol [48], desta forma, ao invés de isolar o éster após a esterificação, foi adicionado hidrato de hidrazina 80% (em sua forma comercial) ao sistema. Além disso, a estequiometria das reações favorece o deslocamento no sentido da formação das benzidrazidas, pois o álcool e o ácido presentes na primeira etapa favorecem a protonação do carbono carbonílico do éster, tornando-o mais susceptível ao ataque nucleofílico pela hidrazina.

Por este caminho sintético foram sintetizados apenas onze compostos – **3a, 3g, 3i, 3l, 3m, 3n, 3o, 3q, 3r, 3s, e 3t** – pois os demais foram sintetizados em quantidades suficientes utilizando-se da primeira etapa, não havendo a necessidade, portanto, de gastar material de partida. As benzidrazidas foram identificadas por meio da faixa de fusão determinada experimentalmente e comparada com dados da literatura. O rendimento médio encontrado para este caminho sintético ficou em 85% e os dados referentes a esta etapa sintética estão descritos na tabela 4.3. Na mesma tabela é apresentado um comparativo entre os rendimentos parciais e totais dos dois caminhos sintéticos abordados neste trabalho. Para efeito de comparação, os dados referentes a obtenção dos compostos 2,4-diclorobenzoato de metila **2r** e 2,4-diclorobenzidrazida **3r** foram retirados da literatura.

Verifica-se que a síntese em uma etapa apresentou valores de rendimento maiores para todos os compostos sintetizados, demonstrando ser esta a melhor opção sintética.

Tabela 4.3 – Dados experimentais obtidos na síntese das benzidrazidas.

	R ₁	R ₂	R ₃	Caminho A (%)			Caminho B (%)	relação B:A
				éster	benzidrazida	global ^a		
2a	H	H	H	89	67	60	88	+ 47%
2g	CH ₂ CH ₃	H	H	87	80	76	85	+ 12%
2i	Cl	H	H	96	88	84	85	+ 1%
2l	OCH ₂ CH ₃	H	H	89	85	84	93	+ 10%
2m	NO ₂	H	H	96	51	49	76	+ 55%
2n	CF ₃	H	H	81	59	48	81	+ 69%
2o	Br	H	H	98	82	80	95	+ 18%
2q	I	H	H	95	78	74	91	+ 23%
2r	Cl	H	Cl	85 ^b	88 ^c	74	80	+ 8%
2s	Cl	Cl	H	88	90	79	90	+ 14%
2t	NO ₂	CF ₃	H	89	66	59	73	+ 24%
rendimento médio				90	76	70	85	+ 22%

a: % global = $\frac{\% \text{ éster} \times \% \text{ benzidrazida}}{10^2}$;

b: [58]

c: [59]

4.4.2 Obtenção do 5-formilbenzofuroxano – 2^a etapa

A primeira etapa realizada na obtenção de 5-formilbenzofuroxano **6** consistiu em reação de substituição nucleofílica aromática [45, 46], figura 4.18, entre 4-cloro-3-nitrobenzaldeído e o sal azida de sódio. A evidência experimental indica que há duas etapas e por isso o mecanismo de reação às vezes é chamado de *mecanismo de adição/eliminação*. A reação começa com o ataque do nucleófilo (**a**) ao carbono contendo o grupo abandonador. Esta é a *etapa de adição* da reação e produz o intermediário aniônico ciclohexadienil **4.1**. [45]

A etapa de adição nucleofílica é a etapa determinante de velocidade da reação porque o caráter aromático do anel deve ser perdido para dar forma ao ânion

ciclohexadienil. Somente quando o intermediário é estabilizado **4.1a** pela presença de grupos retiradores de elétrons em posição *orto* ou *para* ao grupo abandonador, que a energia de ativação necessária para sua formação será baixa o suficiente para fornecer uma velocidade de reação aceitável [45].

Na segunda etapa da reação, a eliminação ocorre quando o anel sofre rearomatização com a perda do grupo abandonador.

Figura 4.18 – Mecanismo de reação de substituição nucleofílica aromática.

O aldeído teve sua estrutura química comprovada por comparação da faixa de fusão experimental (74 – 75°C) com a da literatura (74 – 75°C) [17]. Obteve-se rendimento próximo de 75%.

A etapa de obtenção de 5-formilbenzofuroxano consistiu em pirólise de *orto*-nitrofenil azidas [17, 60, 61], figura 4.19. O aquecimento do sistema promoveu rearranjo molecular (ciclocondensação), com liberação de nitrogênio gasoso.

Figura 4.19 – Mecanismo de ciclocondensação da *orto*-nitrofenil azida.

O aldeído teve sua estrutura química comprovada por análise espectroscópica de RMN ^1H e RMN ^{13}C e o grau de pureza foi determinado por análise da composição centesimal e comparação da faixa de fusão experimental com a da literatura (68,5–69,0 °C) [17]. Obteve-se rendimento de 80%.

5-formilbenzofuroxano (6): 65,0–66,0 °C, RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz,): δ (ppm): 10,09 (s, 1H, C=O), 8,43 (s, 1H, H4), 7,85 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H7), 7,78 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H6); RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 191,1, 153,2, 136,8, 129,0, 122,1, 119,2, 114,8; Anal. Elem. (C₇H₄N₂O₃): C, 51,27%; H, 2,46%; N, 17,07%. Experimental: C, 51,57%; H, 2,44%; N, 16,93%.

Nesta etapa, também foi utilizado um caminho sintético alternativo, descrito em literatura [41], com o objetivo de comparar qual caminho sintético seria o mais viável. Neste caminho, o aldeído intermediário **6** foi obtido a partir do composto *4-cloro-3-nitrobenzaldeído 4* em uma etapa sintética por meio de uma substituição do grupo cloro

pelo grupo azido seguido de uma ciclização *in situ* sob condições de catálise de transferência de fase, figura 4.20.

Este método é utilizado para acelerar a reação entre substâncias que estão em fases diferentes em uma solução e tem o auxílio de um catalisador que atua como agente transferidor, formando um par iônico com a substância presente na fase aquosa e transferindo-o para a fase orgânica para reagir com o substrato orgânico. Este método apresenta algumas vantagens pois não há necessidade de um tratamento prévio do solvente; aumenta a velocidade da reação, principalmente em substituições nucleofílicas aromáticas; a temperatura necessária para as reações são menores quando comparadas a métodos tradicionais e os equipamentos necessários para este método são simples do ponto de vista operacional [62].

Os sais quaternários de amônio catalisam a reação entre um ânion e o substrato orgânico pela transferência do ânion na fase aquosa, [63] onde não há o contato com o substrato, para a fase orgânica. O primeiro passo se efetua na fase aquosa onde ocorre a troca do pares aniônicos entre o sal quaternário de amônio **(a)** e o sal azida de sódio**(b)**. O íon benziltributilamônio formado **(c)** migra para a fase orgânica levando o ânion azido com ele. Uma vez na fase orgânica, o ânion azido é solvatado fracamente tornando-o mais reativo do que em água ou etanol onde é fortemente solvatado por ligações de hidrogênio. Desta forma, a etapa de adição na substituição nucleofílica ocorre de maneira mais rápida. O cloreto de benziltributilamônio formado nesta etapa **(d)** retorna para a fase aquosa, onde volta a participar do ciclo **(e)** [45].

Fase aquosa *Fase orgânica* *Fase orgânica**Fase aquosa* **Figura 4.20** – Mecanismo de catálise por transferência de fase.

O aldeído teve sua estrutura química comprovada por comparação da faixa de fusão experimental (67,0 – 68,0 °C) com a da literatura (68,5–69,0 °C) [17]. Obteve-se rendimento em torno de 85%.

4.4.3 Obtenção dos derivados benzofuroxânicos – 3ª etapa

A obtenção dos compostos finais envolveu a reação de adição nucleofílica, realizada em duas etapas (figura 4.21), entre um composto carbonílico, 5-formilbenzofuroxano **6** e uma amina, benzidrazidas substituídas **3a – t**. A amina primária reage com o aldeído formando iminas *N*-substituídas, também conhecidas como Bases de Schiff [45]. Na primeira etapa desta reação, ocorre a adição da amina, que atua como nucleófilo, atacando o carbono carbonílico deficiente em elétrons, resultando na formação de um intermediário

tetraédrico chamado de carbinolamina **6.1**. Na segunda etapa, ocorre a eliminação de uma molécula de água da carbinolamina com formação da imina **7**.

Figura 4.21 – Mecanismo de adição nucleofílica.

As etapas de adição e de eliminação são aceleradas em decorrência do pH ácido justificando a mistura de ácidos no meio reacional desta etapa. A acidez do meio facilita a protonação do oxigênio carbonílico do aldeído, entretanto, um meio reacional com pH muito ácido pode converter a amina em sua forma protonada, a qual não tem característica nucleofílica, retardando assim, a velocidade da reação [45].

Os dados referentes a esta etapa sintética estão descritos na tabela 4.4. O rendimento médio obtido ficou em torno de 88%.

Tabela 4.4 – Dados experimentais obtidos na síntese de derivados benzofuroxânicos.

	R ₁	R ₂	R ₃	rendimento (%)	faixa de fusão (°C)
7a	H	H	H	94	214,0 – 215,0
7b	CH ₃	H	H	93	217,0 – 218,0
7c	NH ₂	H	H	90	226,0 – 227,0
7d	OH	H	H	84	295,0 – 296,0
7e	F	H	H	82	196,0 – 197,0
7f	CN	H	H	92	204,0 – 205,0
7g	CH ₂ CH ₃	H	H	88	195,0 – 197,0
7h	OCH ₃	H	H	93	211,0 – 212,0
7i	Cl	H	H	91	212,0 – 213,0
7j	COCH ₃	H	H	87	229,0 – 230,0
7k	N(CH ₃) ₂	H	H	82	214,0 – 215,0
7l	OCH ₂ CH ₃	H	H	89	209,0 – 211,0
7m	NO ₂	H	H	94	262,0 – 263,0
7n	CF ₃	H	H	82	201,0 – 202,0
7o	Br	H	H	90	210,0 – 211,0
7p	SO ₂ NH ₂	H	H	97	272,0 – 273,0
7q	I	H	H	87	228,0 – 229,0
7r	Cl	H	Cl	73	163,0 – 164,0
7s	Cl	Cl	H	91	205,0 – 206,0
7t	NO ₂	CF ₃	H	73	191,0 – 192,0
rendimento médio				88	

Apresenta-se, na tabela 4.5, a seguir, os rendimentos parciais e totais das etapas de preparação dos compostos desta série, comparando os dois caminhos sintéticos utilizados na síntese das benzidrazidas.

Tabela 4.5 – Rendimentos parciais e totais obtidos na síntese dos derivados benzofuroxânicos.

	R ₁	R ₂	R ₃	Caminho A (η %)				Caminho B (η %)			relação B:A
				éster	benzidrazida	imina	global ^a	benzidrazida	imina	global ^a	
7a	H	H	H	89	67	94	56	88	94	83	48%
7b	CH ₃	H	H	87	80	93	65	-	93	-	-
7c	NH ₂	H	H	91	79	90	65	-	90	-	-
7d	OH	H	H	-	-	84	-	-	84	-	-
7e	F	H	H	85	65	82	45	-	82	-	-
7f	CN	H	H	91	63	92	53	-	92	-	-
7g	CH ₂ CH ₃	H	H	87	80	88	61	85	88	75	22%
7h	OCH ₃	H	H	84	61	93	48	-	93	-	-
7i	Cl	H	H	96	88	91	77	85	91	77	1%
7j	COCH ₃	H	H	87	70	87	53	-	87	-	-
7k	N(CH ₃) ₂	H	H	92	88	82	66	-	82	-	-
7l	OCH ₂ CH ₃	H	H	89	85	89	67	93	89	83	24%
7m	NO ₂	H	H	96	51	94	46	76	94	71	55%
7n	CF ₃	H	H	81	59	82	39	81	82	66	69%
7o	Br	H	H	98	82	90	72	95	90	86	18%
7p	SO ₂ NH ₂	H	H	-	-	97	-	-	97	-	-
7q	I	H	H	95	78	87	64	91	87	79	23%
7r	Cl	H	Cl	-	-	73	-	80	73	58	-
7s	Cl	Cl	H	88	90	91	72	90	91	82	14%
7t	NO ₂	CF ₃	H	89	66	73	43	73	73	53	24%

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

10⁴

Utilizando o caminho A, a síntese dos derivados benzofuroxânicos foi realizada em três etapas, com rendimento global médio de 59%, salientando que não constam nesta tabela os valores de rendimento global referente aos compostos *4-hidroxi*[*N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida (**7d**), *4-sulfamoil*[*N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida (**7p**) pois não houve a necessidade da síntese dos seus precursores ésteres e benzidrazídicos. Também não consta nesta tabela o dado de rendimento global do composto *2,4-dicloro*[*N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida (**7r**) pois neste trabalho não foi realizado com êxito a síntese do éster (**2r**) e da benzidrazida (**3r**) precursores deste composto.

O rendimento global médio obtido nos onze compostos sintetizados utilizando o caminho B – **7a, 7g, 7i, 7l, 7m, 7n, 7o, 7q, 7r, 7s, e 7t** – foi de 74%. Houve um ganho médio de rendimento em torno de 27% quando comparado o caminho B em relação ao caminho A, demonstrando assim, que a opção de não isolar o éster e prosseguir com a reação de amonólise após a esterificação do ácido benzóico no mesmo sistema reacional, reflete de maneira positiva no rendimento global.

O composto que melhor demonstra a eficiência desta otimização sintética é o *4-trifluorometil*[*N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida (**7n**). Quando sintetizado em três etapas apresenta rendimento global de 39%, enquanto que sintetizado em duas etapas a partir de seu ácido benzóico, apresentou rendimento global de 66%. Esta diferença reflete em ganho de rendimento real em torno de 70% provando desta forma, que a eliminação de uma etapa sintética traduz não apenas economia de tempo na execução dos procedimentos operacionais, mas também no gasto de materiais utilizados nestes procedimento, além do acréscimo de produtos finais obtidos.

Os compostos finais tiveram suas estruturas químicas comprovadas por meio de análise espectrométrica de RMN ¹H e RMN ¹³C. O grau de pureza foi determinado por análise da composição centesimal. Apresenta-se nas tabelas 4.6 a 4.8, os dados referentes à confirmação das estruturas químicas dos compostos finais.

Tabela 4.6 – Análise elementar dos derivados benzofuroxânicos.

	R ₁	R ₂	R ₃	fórmula molecular	massa molar	CHN experimental			CHN calculado		
						%C	%H	%N	%C	%H	%N
7a	H	H	H	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₃	282,08	59,51	3,58	19,09	59,57	3,57	19,85
7b	CH ₃	H	H	C ₁₅ H ₁₂ N ₄ O ₃	296,09	61,01	4,10	18,93	60,81	4,08	18,91
7c	NH ₂	H	H	C ₁₄ H ₁₁ N ₅ O ₃	297,09	56,51	3,70	23,43	56,56	3,73	23,56
7d	OH	H	H	C ₁₄ H ₁₀ N ₄ O ₄	298,07	55,83	3,44	18,31	56,38	3,38	18,78
7e	F	H	H	C ₁₄ H ₉ FN ₄ O ₃	300,07	55,73	3,15	18,19	56,00	3,02	18,66
7f	CN	H	H	C ₁₅ H ₉ N ₅ O ₃	307,07	58,59	3,01	22,62	58,63	2,95	22,79
7g	CH ₂ CH ₃	H	H	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₃	310,11	58,53	4,30	18,00	61,93	4,55	18,06
7h	OCH ₃	H	H	C ₁₅ H ₁₂ N ₄ O ₄	312,09	57,19	3,88	17,31	57,69	3,87	17,94
7i	Cl	H	H	C ₁₄ H ₉ ClN ₄ O ₃	316,04	53,20	2,83	17,76	53,09	2,86	17,69
7j	COCH ₃	H	H	C ₁₆ H ₁₂ N ₄ O ₄	324,09	59,42	3,74	17,36	59,26	3,73	17,28
7k	N(CH ₃) ₂	H	H	C ₁₆ H ₁₅ N ₅ O ₃	325,12	59,25	4,63	21,32	59,07	4,65	21,53
7l	OCH ₂ CH ₃	H	H	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₄	326,31	58,54	4,12	16,87	58,89	4,32	17,17
7m	NO ₂	H	H	C ₁₄ H ₉ N ₅ O ₅	327,06	51,60	2,79	21,00	51,38	2,77	21,40
7n	CF ₃	H	H	C ₁₅ H ₉ F ₃ N ₅ O ₃	350,06	50,95	2,44	15,99	51,44	2,59	16,00
7o	Br	H	H	C ₁₄ H ₉ BrN ₄ O ₃	359,99	46,61	2,63	15,56	46,56	2,51	15,51
7p	SO ₂ NH ₂	H	H	C ₁₄ H ₁₁ N ₅ O ₅ S	361,05	46,45	3,05	19,62	46,54	3,07	19,38
7q	I	H	H	C ₁₄ H ₉ IN ₄ O ₃	407,97	41,68	2,36	13,71	41,20	2,22	13,73
7r	Cl	H	Cl	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ N ₄ O ₃	350,00	47,56	1,65	15,39	47,89	2,30	15,96
7s	Cl	Cl	H	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ N ₄ O ₃	350,00	47,87	1,72	15,56	47,89	2,30	15,96
7t	NO ₂	CF ₃	H	C ₁₅ H ₈ F ₃ N ₅ O ₅	395,05	45,71	1,98	17,32	45,58	2,04	17,71

Tabela 4.7 – Sinais de RMN ¹H em DMSO-*d*₆ (ppm) dos derivados benzofuroxânicos.

	R ₁	R ₂	R ₃	N-H	N=CH	Ar-H _{benzofuroxano}					Ar-H _{benzeno}			
				(s, 1H)	(s, 1H)	(s, 1H)	(d, 1H)	<i>J</i> _{H6,H7}	(d, 1H)	<i>J</i> _{H7,H6}	(d,2H)	<i>J</i> _{H13,H14}	(d,2H)	<i>J</i> _{H14,H13}
				H10	H8	H4	H6	(Hz)	H7	(Hz)	H13,H17	(Hz)	H14,H16	(Hz)
7a	H ^a	H	H	11,94	8,49	7,80	7,91	9,5	7,68	9,5	7,90	6,9	-	-
7b	CH ₃ ^b	H	H	11,87	8,51	7,80	7,93	9,5	7,71	9,5	7,83	8,1	7,33	8,0
7c	NH ₂ ^c	H	H	11,59	8,48	7,76	7,96	9,5	7,71	9,5	7,70	8,5	6,64	8,6
7d	OH ^d	H	H	11,73	8,50	7,80	7,95	9,5	7,72	9,5	7,84	8,4	6,89	8,4
7e	F	H	H	11,95	8,47	7,81	7,91	9,5	7,69	9,5	7,98	7,0	7,32	7,9
7f	CN	H	H	12,12	8,48	7,79	7,83	9,4	7,79	9,4	8,04	8,2	7,96	8,4
7g	CH ₂ CH ₃ ^e	H	H	11,68	8,50	7,75	7,92	9,5	7,66	9,5	7,85	8,0	7,34	8,0
7h	OCH ₃ ^f	H	H	11,80	8,48	7,79	7,92	9,4	7,70	9,4	7,90	8,6	7,04	8,7
7i	Cl	H	H	11,97	8,45	7,80	7,87	9,4	7,68	9,5	7,91	8,4	7,55	8,5
7j	COCH ₃ ^g	H	H	12,06	8,49	7,81	7,74	9,6	7,68	9,5	8,05	8,4	8,00	8,3

a: 7,61 – 7,57 (m, 1H, H15), 7,56 – 7,48 (m, 2H, H14, H16);

b: 2,40 (s, 3H, CH₃);

c: 5,61 (s, 2H, NH₂);

d: 9,96 (s, 1H, OH);

e: 2,69 (q, 2H, *J*_(Ha, Hb) = 7,5 Hz, CH₂), 1,22 (t, 3H, *J*_(Hb, Ha) = 7,5 Hz, CH₃);

f: 3,84 (s, 3H, CH₃);

g: 2,61 (s, 3H, CH₃).

(Continuação tabela 4.7 – “Sinais de RMN ¹H em DMSO-*d*₆ (ppm) dos derivados benzofuroxânicos”);

				N-H	N=CH	Ar-H _{benzofuroxano}					Ar-H _{benzeno}			
	R ₁	R ₂	R ₃	(s, 1H)	(s, 1H)	(s, 1H)	(d, 1H)	<i>J</i> _{H6,H7}	(d, 1H)	<i>J</i> _{H7,H6}	(d,2H)	<i>J</i> _{H13,H14}	(d,2H)	<i>J</i> _{H14,H13}
				H10	H8	H4	H6	(Hz)	H7	(Hz)	H13,H17	(Hz)	H14,H16	(Hz)
7k	N(CH ₃) ₂ ^h	H	H	11,64	8,48	7,74	7,93	9,6	7,69	9,5	7,82	9,0	6,75	9,0
7l	OCH ₂ CH ₃ ⁱ	H	H	11,80	8,48	7,78	7,92	9,4	7,68	9,5	7,89	8,6	7,02	8,6
7m	NO ₂	H	H	12,22	8,50	7,88	7,95	9,4	7,72	9,4	8,14	8,5	8,35	8,8
7n	CF ₃	H	H	12,13	8,49	7,86	8,15	9,5	7,71	9,6	8,09	7,7	7,87	9,0
7o	Br	H	H	11,97	8,46	7,81	7,88	9,1	7,68	9,1	7,83	8,5	7,70	8,2
7p	SO ₂ NH ₂ ^j	H	H	12,00	8,46	7,79	7,77	9,2	7,65	9,4	8,03	8,2	7,94	8,2
7q	I	H	H	11,98	8,47	7,82	7,89	9,7	7,70	9,7	7,68	8,2	7,90	8,4
7r	Cl ^k	H	Cl	11,80	8,48	7,79	7,92	9,4	7,70	9,4	-	-	-	-
7s	Cl ^l	Cl	H	11,97	8,45	7,80	7,87	9,4	7,68	9,5	-	-	-	-
7t	NO ₂ ^m	CF ₃	H	12,06	8,49	7,81	7,74	9,6	7,68	9,5	-	-	-	-

h: 2,99 (s, 6H, (N(CH₃)₂);

i: 4,13 (q, 2H, *J*_(Ha,Hb) = 6,9 Hz, CH₂), 1,35 (t, 3H, *J*_(Hb,Ha) = 6,9 Hz, CH₃);

j: 7,28 (s, 2H, NH₂)

k: 8,15 (s, 1H, H14), 7,66 (d, 1H, *J*_{17,16} = 8,1 Hz, H17), 7,60 - 7,52 (m, 1H, H16);

l: 8,01 (d, 1H, *J*_{13,17} = 1,5 Hz, H13), 7,79 (d, 1H, *J*_{17,16} = 8,3 Hz, H17), 7,65 (d, 1H, *J*_{16,17} = 8,3 Hz, H16);

m: 8,34 (s, 1H, H13), 8,18 (d, 1H, *J*_{16,17} = 8,1 Hz, H16), 7,71 (d, 1H, *J*_{17,16} = 8,3 Hz, H17).

Tabela 4.8 – Sinais de RMN ^{13}C em $\text{DMSO-}d_6$ (ppm) dos derivados benzofuroxânicos.

	R_1	R_2	R_3	$\text{C}_{\text{carbonílico}}$	$\text{C}_{\text{azometínico}}$	$\text{Ar-H}_{\text{benzofuroxano}}$						$\text{Ar-H}_{\text{benzeno}}$			
				C11	C8	C3a	C4	C5	C6	C7	C7a	C12	C13,C17	C14,C16	C15
7a	H	H	H	163,8	144,2	131,0	114,2	137,3	128,6	115,7	131,7	132,9	127,5	127,9	131,3
7b	CH_3^{a}	H	H	164,4	144,8	129,5	114,9	138,2	129,0	116,5	130,8	131,2	128,4	129,3	142,3
7c	NH_2	H	H	163,5	152,0	128,4	113,3	142,6	137,7	115,5	128,8	119,2	129,3	112,5	158,9
7d	OH	H	H	163,5	144,4	127,6	113,4	136,9	131,1	118,3	129,9	123,8	130,4	115,5	161,5
7e	F	H	H	162,6	144,7	129,7	114,7	137,6	129,0	116,2	129,7	130,6	130,7	115,1	165,9
7f	CN^{b}	H	H	159,8	145,4	129,0	115,2	132,8	127,7	116,7	129,3	136,8	128,6	129,6	117,1
7g	$\text{CH}_2\text{CH}_3^{\text{c}}$	H	H	164,5	148,5	129,5	114,9	138,2	128,3	116,5	131,1	132,5	128,1	128,4	144,8
7h	OCH_3^{d}	H	H	162,7	144,5	130,1	114,7	138,2	129,5	116,5	130,7	125,8	130,3	114,1	164,0
7i	Cl	H	H	159,8	145,3	129,4	115,3	137,2	127,6	116,6	130,2	132,4	130,3	128,8	137,9
7j	COCH_3^{e}	H	H	159,3	145,1	129,1	114,8	136,9	128,8	116,1	129,3	137,4	127,9	128,1	139,2

a: 21,3 (CH_3);

b: 118,1 (CN);

c: 28,5 (CH_2), 15,3 (CH_3);

d: 55,9 (CH_3);

e: 197,3 (C=O), 26,6 (CH_3).

(Continuação tabela 4.8 – “Sinais de RMN ^{13}C em $\text{DMSO}-d_6$ (ppm) dos derivados benzofuroxânicos.”);

	R ₁	R ₂	R ₃	C _{carbonílico}	C _{azometínico}	Ar-H _{benzofuroxano}						Ar-H _{benzeno}			
				C11	C8	C3a	C4	C5	C6	C7	C7a	C12	C13,C17	C14,C16	C15
7k	N(CH ₃) ₂ ^f	H	H	164,1	143,6	127,9	114,3	138,5	126,4	116,3	129,6	119,8	129,9	111,3	153,2
7l	OCH ₂ CH ₃ ^g	H	H	162,0	144,5	129,8	114,8	138,2	129,5	116,6	130,4	125,6	130,3	114,7	164,0
7m	NO ₂	H	H	162,5	146,3	129,6	115,6	137,7	129,4	116,7	129,7	139,4	129,9	123,8	149,5
7n	CF ₃ ^h	H	H	159,8	145,9	131,9	115,5	135,4	126,1	116,7	132,6	137,8	129,2	125,7	137,5
7o	Br	H	H	159,8	145,4	129,9	115,4	138,0	129,4	116,4	130,6	132,9	130,4	131,8	126,0
7p	SO ₂ NH ₂	H	H	164,2	147,4	131,9	115,4	135,5	123,9	116,7	132,6	136,7	129,0	126,1	148,5
7q	I	H	H	159,8	145,4	130,0	115,3	133,2	129,4	116,7	131,8	138,0	130,3	137,8	99,5
7r	Cl ⁱ	H	Cl	162,4	146,8	129,8	114,6	135,0	128,0	118,6	130,7	134,1	-	-	132,2
7s	Cl ^j	Cl	H	162,1	145,9	129,3	115,5	137,9	128,6	116,7	130,3	135,2	-	-	137,8
7t	NO ₂ ^k	CF ₃	H	163,7	147,3	129,7	114,4	137,3	129,3	117,4	130,5	137,7	-	-	149,3

f: 41,2 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$);

g: 64,0 (CH_2), 14,9 (CH_3);

h: 122,5 (CF_2);

i: 135,9 (C13), 131,2 (C14), 129,1 (C16), 131,4 (C17);

j: 131,6 (C13), 134,0 (C14), 131,9 (C16), 130,2 (C17);

k: 128,3 (C13), 122,6 (C14), 127,0 (C16), 133,5 (C17);

A presença dos tautômeros é comprovada por espectroscopia de RMN ^1H (figura 4.22A) onde é observado sinais largos na região de anel aromático, indicando a sobreposição de sinais (figura 4.22A). Uma alternativa para determinar qual tautômero prevalece no equilíbrio é realizar os espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C em alta temperatura (75 °C), possibilitando com que a atribuição dos sinais seja resolvida (figuras 4.22B e 4.22C). A partir da determinação das constantes de acoplamento (J) entre os átomos de hidrogênio do anel benzofuroxânico, é possível determinar se o benzo-substituinte ocupa a posição 5 ou 6, e também, no caso de haver um equilíbrio, determinar qual tautômero prevalece. Neste estudo todos os espectros dos derivados benzofuroxânicos sintetizados **7a** – **t** foram registrados na temperatura de 75 °C e a determinação das constantes de acoplamento demonstraram a presença apenas do tautômero 1,5-dissubstituído.

Figura 4.22 – Espectro de RMN ^1H do composto **7a** registrado em diferentes temperaturas. (A) espectro de RMN ^1H do composto **7a** em DMSO- d_6 registrado a 25 °C. (B) espectro de RMN ^1H do composto **7a** em DMSO- d_6 registrado a 75 °C. (C) espectro de HETCOR do composto **7a** em DMSO- d_6 registrado a 75 °C.

Uma vez confirmadas as estruturas químicas planejadas, aliada aos dados de análise elementar comprovando a pureza dos compostos, o foco deste estudo direciona-se para a avaliação da atividade antibacteriana e anti-*T. cruzi* dos derivados benzofuroxânicos sintetizados.

4.5 Conclusões

Foram sintetizados e identificados, neste trabalho, vinte novos derivados benzofuroxânicos, sendo dezessete *[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida 4-substituídas* e três *N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida dissustituídas*. Suas estruturas químicas foram comprovadas por meio de análise espectrométrica de RMN ¹H e RMN ¹³C. Por determinação da faixa de fusão e análise da composição centesimal comprovou-se o grau de pureza dos compostos. No entanto, para se obter estes compostos finais, foi necessária a síntese de dezessete ésteres e dezoito benzidrazidas a partir de ácidos benzóicos mono e dissustituídos e, também, a síntese do intermediário 5-formilbenzofuroxano a partir do composto *4-cloro-3-nitrobenzaldeído*, totalizando desta forma, a síntese de cinquenta e sete compostos neste trabalho. Ressalta-se que, a respeito dos intermediários, foram sintetizados e identificados dois compostos inéditos, *4-nitro-3-trifluorobenzoato de metila* e *4-nitro-3-trifluorobenzidrazida*.

Apesar da síntese dos intermediários realizada em duas etapas ser extensivamente descrita como sendo de fácil execução e de obtenção de rendimentos satisfatórios, a otimização da síntese das benzidrazidas em uma etapa mostrou-se tão eficiente quanto a síntese em duas etapas. O mesmo pode ser dito a respeito da aplicação do método de síntese do aldeído *5-formilbenzofuroxano* em uma etapa por catálise de transferência de fase. Estas otimizações podem contribuir de maneira positiva no desenvolvimento de novos compostos uma vez que a facilidade operacional e rapidez na obtenção de resultados por estes caminhos sintéticos foram comprovadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BOULTON, A.J., GHOSH, P.B., Benzofuroxans. In: KATRITZKY, A.R., BOULTON, A.J., ed. *Advances in Heterocyclic Chemistry*. 1.ed. Academic Press, **1969**. p. 1-41.
- [2] GASCO, A., BOULTON, A.J. Furoxans and Benzofuroxans. In: KATRITZKY, A.R., BOULTON, A.J., eds. *Advances in Heterocyclic Chemistry*. 1.ed. Academic Press, **1981**. p. 251-340.
- [3] CERECETTO, H., PORCAL, W. Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: Recent developments, *Mini-Rev Med Chem*. 5, 57-71, **2005**.
- [4] CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M. Benzofuroxan and Furoxan. Chemistry and Biology. In: KHAN, M., ed. *Bioactive Heterocycles IV*. Berlin Heidelberg: Springer, **2007**. p. 265-308.
- [5] KATRITZKY, A. R., GORDEEV, M. F. Heterocyclic rearrangements of benzofuroxans and related compounds. *Heterocycles*. 35, 483-518, **1993**.
- [6] GREEN, A.G., ROWE, F.M., The existence of quinonoid salts of *o*-nitro-amines and their conversion into oxadiazole oxides. *J Chem Soc, Trans*, 101, 2452-2459, **1912**.
- [7] BOYER, J.H., REINISCH, R.F., DANZIG, M.J., STONER, G.A., SAHHAR, F. The Transformation of ψ -*o*-Dinitroso Aromatic Compounds into *o*-Nitroaryl Amines. *J Am Chem Soc*. 77, 5688-5690, **1955**.
- [8] HAMMICK, D.L., EDWAKDES, W.A.M., STEINER, E.R. The constitution of benzfurazan and benzfurazan oxide. *J Chem Soc*. 3308-3313, **1931**.
- [9] KATRITZKY, A.R., OESNE, S., HARRIS, R.K. The structure of benzofuroxans. *Chemistry & Industry*. 990-992, **1961**.
- [10] BOULTON, A.J., GHOSH, P.B., KATRITZKY, A.R. N-Oxides and related compounds. XXVIII. 5-Amino- and 5-hydroxybenzofuroxans. *J Chem Soc. Section C: Organic*. 10, 971-976, **1966**.
- [11] BOULTON, A. J. KATRITZKY, A. R. SEWELL, M. J., WALLIS, B. N-Oxides and related compounds. XXXI. Nuclear magnetic resonance spectra and tautomerism of some substituted benzofuroxans. *J Chem Soc. [Section] B: Physical Organic*. 9, 914-919, **1967**.

- [12] DIEHL, P., CHRIST, H.A., MALLORY, F.B. O17 nuclear resonance studies on benzofurazan oxide. *Helvetica Chimica Acta*. 45, 504-506, **1962**.
- [13] RAUHUT, G. Combined *Ab Initio* and density functional study of ring-chain tautomerism in benzofurazan 1-oxide. *J Comput Chem*. 17, 1848-1856, **1996**.
- [14] FRIEDRICHSEN, W. Benzofuroxan -o-Dinitrosobenzene Equilibrium. A Computational Study. *J Phys Chem*. 98, 12933-12937, **1994**.
- [15] DUNKIN, I.R., LYNCH, M.A., BOULTON, A.J., HENDERSON, N. 1,2-Dinitrosobenzene in argon matrices at 14 K. *J Chem Soc, Chem Commun*. 1178-1179, **1991**.
- [16] HARRIS, R. K., KATRITZKY, A. R., ØKSNE, S., BAILEY, A. S., PATERSON, W. G. N-oxides and related compounds. Part XIX. Proton resonance spectra and the structure of benzofuroxan and its nitro-derivatives. *J Chem Soc*. 197-203, **1963**.
- [17] GHOSH, P.B., WHITEHOUSE, M.W. Potential antileukemic and Immunosuppressive Drugs. Preparation and *in Vitro* Pharmacological Activity of Some Benzo-2,1,3-oxadiazoles (Benzofurazans) and Their N-Oxides (Benzofuroxans). *J Med Chem*. 11, 305 – 310, **1968**.
- [18] WANG, P.G., XIAN, M., TANG, X., WU, X., WEN, Z., CAI, T., JANCZUK, A.J. Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. *Chem Rev*. 102, 1091–1134, **2002**.
- [19] DUSSE, L.M.S.A., VIEIRA, L.M., CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol Med Lab*. 39, 343-350, **2003**.
- [20] GHOSH, P.B., WHITEHOUSE, M.W. Potential Antileukemic and Immunosuppressive Drugs. II. Further Studies with Benzo-2,1,3-oxadiazoles (Benzofurazans) and Their N-Oxides (Benzofuroxans). *J Med Chem*. 12, 505 – 507, **1969**.
- [21] FLORA FILHO, R., ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev Assoc Med Bras*. 46, 265-271, **2000**.
- [22] GHOSH, P. B, EVERITT, B. J. Furazanobenzofuroxan, furazanobenzothiadiazole, and their N-oxides. A new class of vasodilator drugs. *J Med Chem*. 17, 203-206, **1974**.

- [23] MEDANA, C., DI STILO, A., VISENTIN, S., FRUTTERO, R., GASCO, A., GHIGO, D., BOSIA, A. NO Donor and Biological Properties of Different Benzofuroxans. *Pharm Res.* 16, 956-960, **1999**.
- [24] BUSSYGINA, O. G., PYATAKOVA, N. V., KHROPOV, YU. V., OVCHINNIKOV, I. V., MAKHOVA, N. N., SEVERINA, I. S. Benzodifuroxan as an NO-dependent activator of soluble guanylate cyclase and a novel highly effective inhibitor of platelet aggregation. *Biochemistry.* 65, 457-462, **2000**.
- [25] FIORUCCI, S. Synthesis and pharmacological characterization of a novel nitric oxide-releasing diclofenac derivative containing a benzofuroxan moiety. *Trends Immunol.* 22, 232-235, **2001**.
- [26] INSEL, P.A. Fármacos analgésico-antipiréticos e antiinflamatórios e medicamentos usados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G., ed. Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica. 9.ed., New York: McGraw-Hill, **1996**, p.450-498.
- [27] MONTEIRO, E.C.A., TRINDADE, J.M.F., DUARTE, A.L.B.P., CHAHADE, W.H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). *Temas Reumatol Clín.* 9, 53-63, **2008**.
- [28] CARVALHO, P.S., MAROSTICA, M., GAMBERO, A., PEDRAZZOLI, J. Synthesis and pharmacological characterization of a novel nitric oxide-releasing diclofenac derivative containing a benzofuroxan moiety. *Eur J Med Chem.* 45, 2489-2493, **2010**.
- [29] CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., RISSO, M., SAENZ, P., SEOANE, G., DENICOLA, A., PELUFFO, G., QUIJANO, C., OLEA-AZAR, C. 1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure – Activity Relationships. *J Med Chem.* 42, 1941-1950, **1999**.
- [30] AGUIRRE, G., BOIANI, M., CERECETTO, H., GERPE, A., GONZÁLEZ, M., FERNÁNDEZ SAINZ, Y., DENICOLA, A., OCHOA DE OCÁRIZ, C., NOGAL, J., MONTERO, D., ESCÁRIO, J. Novel Antiprotozoal Products: Imidazole and Benzimidazole N-Oxide Derivatives and Related Compounds. *Arch Pharm.* 337, 259-270, **2004**.
- [31] BOIANI, M., BOIANI, L., DENICOLA, A., TORRES, S., SERNA, E., VERA DE BILBAO, N., SANABRIA, L., YALUFF, G., NAKAYAMA, H., ROJAS DE ARIAS, A., VEGA, C., ROLAN, M., GOMEZ-BARRIOS, A., CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M. 2H-Benzimidazole 1,3-dioxide

derivatives: A new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents. *J Med Chem.* 49, 3215–3220, **2006**.

[32] GERPE, A., AGUIRRE, G., BOIANI, L., CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M., OLEA-AZAR, C., RIGOL, C., MAYA, J. D., MORELLO, A., PIRO, O., ARÁN, V. J., AZQUETA, A., LOPEZ DE CERAIN, A., MOGE-VEGA, A., ROJAS DE ARIAS, A., YALUFF, G. Indazole *N*-oxide derivatives as antiprotozoal agents: Synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies. *Bioorg Med Chem.* 14, 3467–3480, **2006**.

[33] AGUIRRE, G., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., MONTROYA ALFARO, M. E., JASO, A., ZARRANZ, B., ORTEGA, M. A., ALDANA, I., MOGE-VEGA, A. Quinoxaline *N,N'*-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett.* 14, 3835–3839, **2004**.

[34] AGUIRRE, G., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., PORCAL, W., SEOANE, G., DENICOLA, A., ORTEGA, M. A., ALDANA, I., MOGE-VEGA, A. Benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazole *N*-oxide Derivatives as Potential Antitrypanosomal Drugs. Structure-Activity Relationships. Part II. *Arch Pharm.* 335, 15–21, **2002**.

[35] AGUIRRE, G., BOIANI, L., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., PORCAL, W., THOMSON, L., TÓRTORA, V., DENICOLA, A., MÖLLER, M. Benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazole *N*-oxide Derivatives as Potential Antitrypanosomal Drugs. Part III. Substituents-Clustering Methodology in the search of new active compounds. *Bioorg Med Chem.* 13, 6324–6335, **2005**.

[36] OLEA-AZAR, C., RIGOL, C., MENDIZÁBAL, F., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., PORCAL, W., MORELLO, A., REPETTO, Y., MAYA, J. D. Novel Benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazole *N*-oxide derivatives as Antichagasic Agents: Chemical and Biological Studies. *Lett Drugs Des Dev.* 2, 294–301, **2005**.

[37] PORCAL, W., HERNANDEZ, P., AGUIRRE, G., BOIANI, L., BOIANI, M., MERLINO, A., FERREIRA, A., DI MAIO, R., CASTRO, A., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H. Second generation of 5-Ethenylbenzofuroxan derivatives as Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem.* 15, 2768–2781, **2007**.

[38] CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M. Synthetic Medicinal Chemistry in Chagas' Disease: Compounds at The Final Stage of "Hit-To-Lead" Phase. *Pharmaceuticals.* 3, 810-838, **2010**.

[39] PORCAL, W., HERNANDEZ, P., BOIANI, M., AGUIRRE, G., BOIANI, L., CHIDICHIMO, A., CAZZULO, J., CAMPILLO, N. E., PAEZ, J. A., CASTRO, A., KRAUTH-SIEGEL, R. L., DAVIES, C., BASOMBRÍO, M. A., GONZÁLEZ, M., CERECETTO, H. In vivo anti-Chagas vinylthio-, vinylsulfinyl-, and vinylsulfonylbenzofuroxan derivatives, *J Med Chem.* 50, 6004–6015, **2007**.

[40] BOIANI, L., DAVIES, C., ARREDONDO, C., PORCAL, W., MERLINO, A., GERPE, A., BOIANI, M., PACHECO, J. P., BASOMBRÍO, M. A., CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M. In vivo studies of 5-arylethenylbenzofuroxans in acute murine models of Chagas' disease. *Eur J Med Chem.* 43, 2229–2237, **2008**.

[41] AYYANGAR, N.R., MADAN KUMAR, S., SRINIVASAN K.V. Facile One-Pot Synthesis of 2,1,3-Benzoxadiazole *N*-Oxide (Benzofuroxan) Derivatives Under Phase-Transfer Catalysis *Synthesis.* 7, 616 – 618, **1987**.

[42] EL-OBEID, H.A., ELNIMA, E.I., AL-BADR, A.A. Synthesis and Antimicrobial Activity of New Furan Derivatives. *Pharm Res.* 2, 42 – 43, **1985**.

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

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

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

[46] MARCH, J. Advanced Organic Chemistry: reactions, mechanisms and structures. 5 ed. New York: John Wiley, **2001**.

[47] SOLOMONS, G., FRYHLE, C. Organic Chemistry. 8 ed. New York: John Wiley & Sons, **2004**.

[48] MORRISON, R, BOYD, R. Química orgânica. 11 ed. Lisboa: Fundação Caloust Gulbenkian, **1994**.

- [49] TAVARES, L.C., PENNA, T.C.V., AMARAL, A.T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. I. *Boll Quim Farm.* 136, 244 – 249, **1997**.
- [50] REZENDE, P. Relações quantitativas estrutura-atividade de derivados de 5-nitro-2-tiofilidênicos: planejamento, síntese e determinação da atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. São Paulo, 2002. 182p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- [51] TAVARES, L.C., CHISTÉ, J.J., SANTOS, M.G.B., PENNA, T.C.V. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs II. *Boll. Chim. Farm.* 138, 432 – 436, **1999**.
- [52] MASUNARI, A. Planejamento, desenvolvimento e estudos de QSAR-2D e QSAR-3D de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* multi-resistente (CEB-Clone Endêmico Brasileiro). São Paulo, **2005**. 231p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- [53] RODRIGUES, A. M. Síntese e determinação da concentração inibitória mínima frente a *Staphylococcus aureus* de 5-nitro-2-furfurilideno benzidrazidas substituídas. São Paulo, **2000**. 101p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- [54] SCHMIDT, H.D. Hydrazine and its Derivatives: Preparation, Properties and Applications. 1 ed. John Wiley: New York, **1984**.
- [55] LAUWINER, M., ROTH, R., RYS, P. Reduction of aromatic nitro compounds with hydrazine hydrate in the presence of an iron oxide/hydroxide catalyst. III. The selective reduction of nitro groups in aromatic azo compounds, *Appl Catal., A.* 177, 9 – 14, **1999**.
- [56] DEKA, D.C., KAKATI, H.S. Selective reduction of aromatic nitro groups in the presence of amide functionality. *J Chem Res.* 4, 223 – 224, **2006**.
- [57] SILVERSTEIN, R.M., BASLER, G.C., MORRIL, T.C. Spectrometric identification of organic compounds. 7.ed. New Jersey: John Wiley & Sons, **2005**.

- [58] SILVA, N.M., TRIBUTINO, J.L.M., MIRANDA, A.L.P., BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. New isoxazole derivatives designed as nicotinic acetylcholine receptor ligand candidates. *Eur J Med Chem.* 37, 163 – 170, **2002**.
- [59] MACAEV, F., RUSU, G., POGREBNOI, S., GUDIMA, A., STINGACI, E., VLAD, L., SHVETS, N., KANDEMIRLI, F., DIMOGLO, A., REYNOLDS, R. Synthesis of novel 5-aryl-2-thio-1,3,4-oxadiazoles and the study of their structure-anti-mycobacterial activities, *Bioorg Med Chem.* 13, 4842 – 4850, **2005**.
- [60] BOYER, J.H., CANTER, F.C. Alkyl and Aryl Azides. *Chem Rev.* 54, 1 – 57, **1954**.
- [61] DYALL, L.K. Pyrolysis of aryl azides. III. Steric and electronic effects upon reaction rate. *Aust J Chem.* 28, 2147 – 2159, **1975**.
- [62] LUCCHESI, A.M., MARZORATI, L. Catálise de transferência de fase. *Quím. Nova.* 23, 641 – 652, **2000**.
- [63] MCINTOSH, J.M. Phase-transfer catalysis using quaternary 'Onium salts. *J Chem Educ.* 55, 235 – 238, **1978**.

*Determinação da atividade frente a *Staphylococcus aureus**

5.1 Introdução

A introdução de agentes antimicrobianos na terapêutica ocorrida nos últimos 60 anos, representou um dos maiores avanços da medicina moderna. A descoberta da penicilina, por Alexander Fleming em 1928, iniciou a denominada “Era dos Antibióticos”, a qual, principalmente entre os anos de 1940 – 1960, foi caracterizada por um rápido desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, mais seguros e eficazes, capazes de combater o agente causador de diversos tipos de doenças infecciosas, ajudando assim, na redução dos casos de morbidade e principalmente mortalidade atribuídos a infecções bacterianas [1]. Vistos inicialmente como fármacos verdadeiramente milagrosos, o acesso aos primeiros antibióticos sistêmicos (sulfonamidas e penicilina) não estava disponível para a população em geral. De fato, esses medicamentos eram escassos e caros e foram inicialmente reservados para o uso pelos militares durante a II Guerra Mundial [2].

A descoberta de novos agentes antimicrobianos, assim como a otimização dos processos de obtenção e fabricação dos mesmos, fizeram o uso destes fármacos tornarem-se generalizados e, assim, foram utilizados para tratar os mais diferentes tipos de infecções, desde as mais banais até mesmo as de natureza não-bacterianas [2]. Entretanto, o surgimento de resistência microbiana também acompanhou este desenvolvimento, desde o começo, detectando-se atualmente, cepas resistentes às diversas classes de antibióticos [3]. Mesmo Alexander Fleming, em 1945, alertou que o uso inadequado de penicilina poderia levar à seleção de “formas mutantes” resistentes de *Staphylococcus aureus* [4].

Durante as últimas décadas, o número de cepas bacterianas isoladas com perfil de resistência, tais como *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA, *Methicillin-resistant S. aureus*), *Escherichia coli* resistente à cefalosporina, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenem, dentre outras, tem aumentado significativamente a ponto de se tornarem além de uma pandemia, em graves problemas nos ambientes hospitalares [2, 5]. Recentemente no Brasil, a identificação de *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) tem sido relatada em diversos hospitais. Somente no Estado de São Paulo, desde julho de 2009, 24 pessoas morreram infectadas por esta bactéria. No Distrito Federal, o número de contaminações é

superior a 183 casos com 18 mortes decorrentes da infecção. Esta bactéria foi relatada ainda nos Estados de Goiás, Espírito Santo, Minas Gerais e Santa Catarina [6].

Segundo LEVY [7], o problema da resistência microbiana pode ser atribuído a dois fatores principais: ao agente antimicrobiano, que inibe microrganismos sensíveis e seleciona os resistentes, e aos determinantes genéticos de resistência selecionados nos microrganismos pelo uso do agente antimicrobiano. Desta forma, a resistência bacteriana surge quando estes dois fatores se encontram e atuam conjuntamente em um ambiente ou em um hospedeiro [7]. Uma vez que os determinantes genéticos são responsáveis por codificarem o tipo e a intensidade da resistência a ser expressa pelas células bacterianas, como resultado da seleção dessas bactérias resistentes é a seleção dos genes que irão se disseminar para outras bactérias [2, 7].

O desenvolvimento de resistência bacteriana pode ser de dois tipos: natural (intrínseco) ou adquirido e podem ser transmitidos horizontalmente ou verticalmente. O **mecanismo de resistência natural** é causado por uma mutação genética espontânea, ou seja, ocorre independentemente da exposição do microrganismo ao agente antimicrobiano [8, 9]. Apesar de ser um mecanismo menos comum do que o mecanismo adquirido, o mecanismo natural pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de resistência [2]. O **mecanismo de resistência adquirida** envolve a indução de resistência provocada pela exposição do microrganismo ao antibiótico [8], induzindo a uma resposta de adaptação bacteriana [2, 10]. Este tipo de resistência é o que ocorre comumente [2], e dentre os vários tipos de adaptação bacteriana, citam-se alguns: *i)* a aquisição de genes que codificam enzimas, inativando assim o agente antimicrobiano antes que ele possa desencadear o efeito biológico; *ii)* as bactérias podem desenvolver bombas de efluxo capazes de expulsar o antimicrobiano da célula antes que ele possa chegar e atingir o seu alvo específico; *iii)* a bactéria pode adquirir diversos genes para uma via metabólica responsável pela produção de uma parede celular alterada, limitando desta forma o acesso do agente antimicrobiano ao alvo intracelular; dentre outros [11].

A transmissão destes mecanismos de resistências pode ocorrer via **transmissão vertical** na qual os microrganismos resistentes sobrevivem em determinados ambientes, e após sua divisão o seu genoma é duplicado originando uma célula idêntica [12]. A

transmissão horizontal ocorre entre bactérias de mesma espécie ou entre diferentes espécies as quais trocam entre si os determinantes genéticos de resistência, por meio de fenômenos como transformação, transdução, transposição e conjugação [12, 13].

A mutação genética, assim como a transmissão horizontal de determinantes genéticos de resistência, além da co-existência de genes que conferem a resistência a diversos agentes antimicrobianos em um mesmo elemento móvel, possibilita a sobrevivência de bactérias sob pressão seletiva de diferentes classes de antimicrobianos [2, 12, 14]. Assim, através destes mecanismos de intercâmbio genético, muitas bactérias tornaram-se resistentes a várias classes de agentes antimicrobianos, e essas bactérias multirresistentes (definida como a resistência para 3 classes de medicamentos antibacterianos) tornaram-se um motivo para preocupação em escala mundial, principalmente em hospitais e outras instituições de saúde onde elas tendem a ocorrer mais frequentemente [11]. Dentre estas bactérias, a espécie *S. aureus* é reconhecida como um dos principais patógenos nas infecções humanas [15], pois ocorrem frequentemente em pacientes hospitalizados, resultando em consequências graves principalmente com relação a antibioticoterapia [16].

S. aureus são cocos gram-positivos, de tamanho variável entre 0,5 e 1,5µm de diâmetro, imóveis, não esporulados e capsulados. Podem aparecer isolados, aos pares, na forma de tétrades, cadeias curtas ou na forma de cachos irregulares. São anaeróbios facultativos, com metabolismo oxidativo e fermentativo, e utilizam carboidratos e aminoácidos como fontes de energia e carbono [17].

A parede celular desses microrganismos envolve totalmente a membrana citoplasmática, figura 5.1. Tal parede mantém a forma e protege tais microrganismos que possuem uma alta pressão osmótica interna. A parede celular de *S. aureus* contém glicopeptídeos (polímeros de *N*-acetilglicosamina e de ácido *N*-acetilmurâmico) ligados de forma cruzada, e ácidos teicóicos que são polímeros de ribitol (monossacarídeos de cinco carbonos) com fosfatos. Os ácidos teicóicos atuam na aderência específica das bactérias gram-positivas às superfícies mucosas [18]. A composição da ligação peptídica cruzada é típica de cada microrganismo e confere a rigidez final da parede celular. A espessura da

camada de peptideoglicanos desta espécie de bactéria é de 50 a 100 moléculas enquanto que a de bactérias gram-negativas possuem apenas uma ou duas [17].

Figura 5.1 – Estrutura da parede celular que envolve a membrana citoplasmática de bactérias gram-positivas.

Uma propriedade biológica fundamental do *S. aureus* é a sua capacidade de colonizar assintomaticamente indivíduos saudáveis [19]. Aproximadamente 30% das pessoas são portadoras nasais assintomáticas de *S. aureus*, desta forma, nestes indivíduos a bactéria faz parte da microbiota natural [16, 19]. Os portadores de *S. aureus* apresentam um alto risco de infecção, além de se tornarem importantes incubadores capazes de disseminar estas cepas para outros indivíduos [19]. O principal modo de transmissão de *S. aureus* é por contato direto, geralmente o contato dérmico com indivíduos colonizados, além de contato também com objetos e superfícies contaminadas [20]. Dentre os fatores que podem predispor a infecção citam-se a perda da barreira de proteção da pele, presença de doenças subjacentes, tais como AIDS e diabetes, e deficiência da função neutrofílica [19]. Uma vez

que os *habitats* naturais de *S. aureus* são as membranas mucosas e a pele de seres humanos, a epidemiologia inicial das infecções estafilócicas eram focadas no tipo de infecção e se houve ou não septicemia associada [21]. Antes da descoberta dos antibióticos, a mortalidade por sepse devido ao *S. aureus* alcançava mais de 80% dos indivíduos infectados [21, 22].

Um dos primeiros antimicrobianos desenvolvidos para vencer essa bactéria foi a sulfonamida. Usada entre 1937 e 1942, em diversas infecções, porém não se mostrava eficaz nos casos de osteomielites causadas pelo *S. aureus* [23]. A partir de 1942, a penicilina passou a ser utilizada para o tratamento de humanos e rapidamente reduziu a mortalidade por sepses de 80% para 35% [24], tendo sido o primeiro antibiótico a ter sucesso no tratamento das infecções causadas por este microrganismo.

O mecanismo de ação da penicilina se deve à ligação desse fármaco a proteínas de ligação à penicilina (PBP, *Penicilin Binding Protein*), que são receptores celulares, e existem em número de cinco nas espécies de *S. aureus* [25, 26]. Diferentes PBPs podem exibir afinidades diferentes por determinado fármaco e cada um pode mediar um modo particular de ação, como por exemplo, a ligação da penicilina a uma PBP pode causar alongamento anormal da célula e a outra PBP pode resultar em lise celular [27]. Os peptidoglicanos são sintetizados em três etapas sendo que a última, que culmina no término da formação da ligação cruzada, envolve uma transpeptidação por transpeptidase ligada à membrana. A ligação da penicilina às transpeptidases gera inibição dessa transpeptidação e, portanto, influi na síntese da parede celular. Essa inibição das transpeptidases parece decorrer da semelhança dos antibióticos beta-lactâmicos com a acil-D-alanil-D-alanina uma vez que a reação de transpeptidação envolve a perda de uma D-alanina do pentapeptídeo precursor do proteoglicano [27].

Em 1944, KIRBY [28] descreve a extração de um “potente inibidor de penicilina” em 7 cepas de *S. aureus* naturalmente resistentes, uma vez que todos os pacientes de onde foram coletadas as amostras não receberam tratamento prévio com penicilina.

O *S. aureus* adquiriu resistência por meio de produção de penicilinase, cuja expressão genética é transmitida entre as cepas por transferência de plasmídeos, e é a

enzima responsável pela hidrólise do anel beta-lactâmico das penicilinas, o qual é essencial para a atividade antimicrobiana [19, 29].

A meticilina foi introduzida em 1959 para tratar infecções causadas por estas cepas de *S. aureus* resistentes [30]. Entretanto em 1961, JEVONS [31] descreve o isolamento no Reino Unido de cepas resistentes a meticilina. Em 1967, novos casos foram reportados em outros países europeus, assim como na Austrália e Índia, e a partir dos anos 80, houve relatos de cepas MRSA em vários países [30, 32]. Atualmente estas cepas são endêmicas em vários hospitais em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento [32]. Estima-se que 60 – 70% das cepas isoladas mundialmente são cepas MRSA [33].

O mecanismo de resistência à meticilina desenvolvido pelo *S. aureus* está também relacionado com as PBPs. As **cepas MRSA** produzem uma PBP alterada de baixa afinidade para vários antibióticos beta-lactâmicos, denominada de PBP2a ou 2'. Uma vez inativadas por antibióticos beta-lactâmicos, a PBP2a tem a capacidade de suprir as funções destas PBPs normais. A PBP2a pode ter sido originada pela fusão dos genes da beta-lactamase estafilocócica e do gene de PBP de outras bactérias e é codificada pelo gene *mecA* [19, 25, 34]. Esta PBP2a mostra baixa afinidade, não apenas à meticilina, mas praticamente a todos os antibióticos beta-lactâmicos, inclusive carbapenemas, cefalosporinas e monobactâmicos [19, 34].

No início, as cepas MRSA estavam restritas a centros médicos de referência e hospitais terciários, mas logo se alastraram para serviços e centros de saúde menores [35]. Estas **cepas HA-MRSA** (*Health-Care Associated Methicillin Resistant S. aureus*) continuam a ser um grande problema em muitas instituições, e representam mais de 50% das cepas isoladas em pacientes de unidades de terapia intensiva (UTIs) e cerca de 40% das cepas isoladas de pacientes não-UTI [36]. Dentre os fatores de risco para infecções por HA-MRSA incluem a internação prolongada, uso de dispositivos invasivos como catéteres e tubos de alimentação, exposição prévia a agentes antimicrobianos, hemodiálise, dentre outros [36, 37].

A partir da década de 90, infecções causadas por MRSA foram descritas entre pessoas que não apresentavam fatores de risco para tais [19, 35, 36]. Estas **cepas CA-MRSA**

(*Community-Associated Methicillin Resistant S. aureus*) foram relatadas em pacientes jovens e saudáveis e associadas à participação em esportes de contato, compartilhamento de toalhas, uso ilegal de drogas endovenosas e lugares insalubres [33, 37], além disso, estas cepas também foram identificadas por ocorrerem em pacientes que não foram hospitalizados no ano anterior e que não se submeteram a procedimentos médicos [38].

Os primeiros relatos de casos de infecções por CA-MRSA ocorreram entre aborígenes australianos e nativos americanos no Canadá [19, 39]. Posteriormente, estas infecções se propagaram resultando em diversos surtos, tanto nos Estados Unidos como em diversos outros países [39]. Atualmente, surtos e epidemias por CA-MRSA são relatados em todo o mundo e tem uma epidemiologia semelhante às cepas HA-MRSA, embora os clones específicos de CA-MRSA variarem de acordo com a localização geográfica [19]. De acordo com CHAMBERS [19], as cepas CA-MRSA não são “fugitivas” das unidades de saúde, uma vez que seus genótipos não estão intimamente relacionados com os clones de hospitais e, apresentam susceptibilidade a inúmeros agentes antimicrobianos dos quais as cepas HA-MRSA são resistentes, tais como sulfametoxazol-trimetoprima, clindamicina, tetraciclina, fluoroquinolonas e novos antimicrobianos que também podem ser utilizados [40].

Nas últimas duas décadas, para os casos de infecção por cepas MRSA, uma das poucas opções de tratamento tem sido os antimicrobianos glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina, entretanto, em função da pressão seletiva de vancomicina, surgiram as cepas com susceptibilidade reduzida para este fármaco [19, 26]. No Japão, em 1997, HIRAMATSU [41] descreve o primeiro caso de infecção por *S. aureus* com resistência intermediária a vancomicina (VISA, *Vancomycin-intermediate S. aureus*). Desde então, diversos relatos de isolados de **cepas VISA** ocorreram nos Estados Unidos, França, Coreia, África do Sul e inclusive no Brasil [42, 43]. Em 2000, foram isoladas quatro cepas VISA na ala de queimados e uma cepa na ala de ortopedia em hospital localizado na cidade de São Paulo. Estas cepas geneticamente parecidas evidenciam a disseminação entre pacientes. Este foi o primeiro relato de caso de isolamento desta linhagem de cepas na América Latina [43]. Em 2002, em Michigan/EUA, foi relatado o primeiro caso clínico de infecção por **cepas VRSA** (*Vancomycin-resistant S. aureus*) de *S. aureus* resistente a vancomicina [44], as quais apresentaram uma concentração inibitória mínima (CIM) $\geq 32 \mu\text{g/mL}$ [45].

As recomendações da *Brithish Society for Antimicrobial Chemotherapy* [46], são para que as cepas de *S. aureus* que apresentarem CIM de vancomicina $\geq 4,0$ $\mu\text{g/mL}$ deverão ser consideradas resistentes à vancomicina, uma vez que não respondem ao tratamento com o fármaco. Entretanto, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* dos Estados Unidos [47, 48] determina que as cepas de *S. aureus* que apresentarem CIM $\leq 2,0$ $\mu\text{g/mL}$ são consideradas susceptíveis a vancomicina, as cepas que apresentarem valores de CIM entre 4 e 8 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas como tendo resistência intermediária à vancomicina, e devem, portanto serem denominadas de VISA, enquanto que, apenas as cepas que apresentarem uma CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas resistentes à vancomicina, devendo serem chamadas de VRSA.

A vancomicina apresenta atividade bactericida devido a sua capacidade de bloquear a síntese do peptideoglicano, fundamental para a formação da parede celular bacteriana. A inibição da síntese do peptideoglicano ocorre devido a formação de um complexo entre a porção D-alanil-D-alanina do precursor da parede celular e a vancomicina [49]. O mecanismo de resistência do *S. aureus* à vancomicina ainda não está totalmente elucidado [50]. Porém, acredita-se que seja pelo esgotamento da vancomicina do meio, causado pelo engrossamento da parede celular e consequente aumento do número de sítios de ligação D-alanil-D-alanina [26].

Ao longo das últimas quatro décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica, levou ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos com espectro de ação cada vez mais amplo [51]. A exposição a estes medicamentos, pode desencadear resistência bacteriana, mesmo quando empregados de forma correta, sendo que o uso inadequado agrava esta ocorrência, tornando o principal fator envolvido no surgimento de microrganismos multirresistentes, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos. Para prevenção deste quadro, assim como a disseminação destes microrganismos multirresistentes, é fundamental o estabelecimento de uma política de uso racional de antimicrobianos.

No Brasil, a ANVISA publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 44 de 26 de outubro de 2010 [52], a qual dispõe sobre o controle de medicamentos à base de antimicrobianos. Dentre as determinações desta resolução, os medicamentos somente

poderão ser comercializados à população com retenção de receita médica, evitando assim a automedicação e, conseqüentemente, o uso inapropriado dos mesmos.

A resistência bacteriana demonstrada frente aos agentes antimicrobianos atualmente disponíveis tem se mostrado de grande preocupação internacional. Doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares e, em números, representa cerca de 13,3 bilhões de mortes, equivalente a um quarto do total de óbitos que ocorrem no mundo [26].

Entre os desenvolvimentos recentes em busca de antimicrobianos contra *S. aureus* multirresistentes, destacam-se a fluorquinolonas de amplo espectro, como levofloxacino [53], sitafloxacino [54], apresentando resultados positivos, e a linezolida, que foi aprovada pela FDA em 2000 [55], sendo relatada resistência frente a este fármaco no mesmo ano [56]. Em 2005, o FDA aprovou o uso comercial da tigeciclina, fármaco pertencente a classe denominada glicilciclina, com amplo espectro de ação, incluindo cepas MRSA e cepas resistentes e com resistência intermediária a glicopeptídeos, tais como VRSA e VISA [57].

Embora a descoberta de novos fármacos seja uma importante abordagem para a resolução das lacunas existentes nos tratamentos atuais, deve ser levado em conta os anos de investigação e dos custos associados para trazer novos medicamentos para o mercado [58]. Dessa forma, uma série de estratégias devem ser adotadas conjuntamente para prevenir a disseminação destes microrganismos multirresistentes, tais como o estabelecimento de políticas de uso racional de antimicrobianos, melhorias nas condições de saneamento, redução do uso de antibióticos na pecuária e agricultura, melhorias nos protocolos e procedimentos hospitalares dentre outras.

5.2 Objetivos

Avaliar a atividade antibacteriana dos derivados benzofuroxânicos frente a cepas padrão e multirresistentes de *Staphylococcus aureus* utilizando como parâmetro a concentração inibitória mínima.

5.3 Materiais e Métodos

A determinação da concentração inibitória mínima, CIM, dos compostos sintetizados frente a cepas padrão – ATCC25923 – e multirresistentes – 3SP/R33, VISA3 – de *S. aureus* envolveu duas fases. Na primeira fase foi determinada, de forma quantitativa, a atividade antimicrobiana utilizando-se o método clássico de microdiluição sucessiva [47]. A segunda fase foi adaptada e otimizada para testes de microdiluição a partir da metodologia empregada por TAVARES e colaboradores [59 – 61] com vistas a intensificar a sensibilidade do ensaio. Apresenta-se a seguir, os procedimentos adotados para realização dos ensaios.

5.3.1 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios, ágar PCA¹ e caldo nutritivo TSB², foram preparados de acordo com as especificações do rótulo e esterilizados em autoclave a 121 °C por trinta minutos. O ágar PCA foi utilizado como meio de enriquecimento para contagem total dos microrganismos em placa e para a manutenção das culturas de bactérias. O meio TSB é um meio de propósito geral usado para o cultivo de ampla variedade de microrganismos e foi utilizado na realização dos ensaios da atividade antibacteriana dos compostos.

5.3.2 Preparo das soluções-mãe de compostos a serem testados

As soluções-mãe dos compostos sintetizados foram obtidas segundo esquema apresentado na figura 5.2. Cada composto a ser testado, foi diluído em 10,0 mL de DMSO, a fim de originar solução inicial de concentração equivalente a 800 µg/mL. A partir desta

¹ PCA (*Plate Count Agar*), Fluka and Riedel-de Haën Company. Composição (g/L): Peptona de caseína, 5,0; extrato de levedura, 2,5; dextrose, 1,0; agar bacteriológico, 15,0; pH final: 7,0 ± 0,2;

² TSB (*Tryptic Soy Broth*), Difco Microbiology Products Co. Composição (g/L): Caseína enzimática hidrolisada: 17,0, digestão papaica de soja, 3,0; dextrose, 2,5; cloreto de sódio, 5,0; fosfato dipotássico, 2,5; pH final: 7.3 ± 0.2;

solução foram transferidos 2,0 mL para frasco contendo 8,0 mL de TSB de forma a originar solução de concentração equivalente a 160 µg/mL. Em seguida 1,0 mL da solução de cada composto foi transferido para uma divisória de um reservatório de reagentes com 12 divisórias³, posteriormente empregado na execução dos ensaios. Para cada ensaio, são utilizados 6 divisórias para seis compostos diferentes (A – F), a sétima divisória é reservada para o uso de um fármaco de referência – ampicilina⁴ ou cloranfenicol⁵ ou vancomicina^{6,7} – e a oitava divisória é destinada para o controle de solvente. No nosso estudo foi utilizado DMSO 10% e 20% v/v. As quatro últimas divisórias do reservatório não são utilizadas.

Figura 5.2 – Esquema de preparo das soluções-mãe dos compostos.

Devido a baixa solubilidade dos compostos 4-metil-[N'-(benzofuroxan-5-il) metileno] benzidrazida (**7b**), 4-etil-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7g**) e 4-etóxi-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno] benzidrazida (**7l**), apresentada no meio de cultura TSB, optou-se em preparar soluções-mãe de concentração equivalente a 400 µg/mL. Para os compostos 4-nitro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7m**), 2,4-dicloro-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7r**), 3,4-dicloro-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7s**) e 4-nitro-3-(trifluometil)-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno] benzidrazida (**7t**) foram preparadas soluções-mãe com concentração inicial de 600 µg/mL.

³ Dual solution™ pipetting reservoir – Sigma-Aldrich Corporation;

⁴ Ampicilina 99% – Fluka and Riedel-de Haën Company;

⁵ Cloranfenicol 99% – Sigma-Aldrich Corporation;

⁶ Cloridrato de vancomicina (2% water) – Sigma-Aldrich Corporation;

⁷ Vancocina CP®, cloridrato de vancomicina (genérico) – ABL Antibiótico do Brasil, LTDA.

5.3.3 Preparo do inóculo

Preparo do inóculo de cepa ATCC25923

O preparo do inóculo de cepa padrão ATCC25923 de *S. aureus* foi realizado segundo esquema apresentado na Figura 5.3. As culturas de *S. aureus* foram cultivadas em três tubos de ensaio contendo PCA inclinado e incubadas a 35°C por 24 horas. Procedeu-se a lavagem das colônias utilizando-se para cada tubo 5,0 mL de solução fisiológica (SF) previamente esterilizada. As suspensões foram transferidas para frasco contendo pérolas de vidro e barra magnética, seguido de agitação constante por 30 minutos, a fim de obter a homogeneização do meio. Transferiu-se 1,0 mL desta suspensão para frasco contendo 99,0 mL de solução fisiológica, pérolas de vidro e barra magnética, seguido de agitação constante por 15 minutos, gerando suspensão com concentração de microrganismos de $1,0 \times 10^{-2}$ em relação a suspensão inicial. Este mesmo procedimento foi repetido para gerar a suspensão de concentração $1,0 \times 10^{-4}$. Para obter o inóculo final, foi transferido 1,0 mL da suspensão anterior, para frasco contendo 99,0 mL TSB, pérolas de vidro e barra magnética e mantido sob agitação por 15 minutos, gerando suspensão com concentração de microrganismos de $1,0 \times 10^{-6}$ em relação a suspensão inicial e equivalente a 10^4 unidades formadoras de colônia/mL. Esta solução foi transferida para reservatório de reagente simples com tampa⁸ para posterior utilização nos ensaios.

⁸ Texan™ reagent reservoir for multichannel pipettes – Sigma-Aldrich Corporation.

Figura 5.3 – Esquema de preparo de inóculo da cepa ATCC25923.

Preparo do inóculo de cepas 3SP/R33 e VISA3

O preparo do inóculo de cepas multirresistentes 3SP/R33⁹ e VISA3¹⁰ de *S. aureus* foi realizado segundo esquema apresentado na Figura 5.4. As cepas multirresistentes, estocadas em glicerol e mantidas congeladas foram diluídas em meio de cultura TSB na proporção de 1:200 (v/v). Esta suspensão foi incubada à 35 °C por 20 horas, sendo que após este período, obtém-se suspensão com turbidez equivalente à solução padrão 0,5 na escala de McFarland¹¹ e os detalhes para o preparo do controle de turbidez estão descritos no Anexo 2, “Controle de turbidez para o preparo do inóculo”. Esta suspensão apresenta concentração de aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL. Transferiu-se 1,0 mL desta suspensão para frasco contendo 99,0 mL de solução fisiológica, pérolas de vidro e barra magnética, seguido de agitação constante por 15 minutos, gerando suspensão com concentração de microrganismos de 1,0 x 10⁻² em relação a suspensão inicial. Para obter o inóculo final, foi transferido 1,0 mL da suspensão anterior, para frasco contendo 99,0 mL TSB, pérolas de vidro e barra magnética e mantido sob agitação por 15 minutos, gerando

⁹ *Staphylococcus aureus*, cepa 3SP/R33, isolada de pacientes hospitalizados no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – SP [43, 62];

¹⁰ *Staphylococcus aureus*, cepa VISA3, cepa isolada de biopsia de queimadura de pacientes hospitalizados no Hospital Geral Vila Penteado em São Paulo – SP [63];

¹¹ Tubo 0,5 da escala de McFarland – cloreto de bário dihidratado 0,048 mol/L, 0,5mL; ácido sulfúrico 0,36N, 99,5 mL.

suspensão de 10^4 UFC/mL. Esta solução foi transferida para reservatório de reagente simples com tampa para posterior utilização nos ensaios.

Figura 5.4 – Esquema de preparo de inóculo das cepas 3SP/R33 e VISA3.

5.3.4 Determinação da concentração inibitória mínima, CIM

Fase I

Na primeira etapa de determinação da concentração inibitória mínima, intitulada fase I, foi determinada a atividade antibacteriana dos compostos obtidos de forma quantitativa, utilizando-se o método clássico de microdiluição seriada em caldo [47], e apresenta-se esquematizado na Figura 5.5. Nesta etapa foram distribuídos 100 μ L das soluções-mãe dos compostos (A – F), do fármaco de referência (G) e do controle de DMSO (H), na coluna 1, 2 e 11 das microplacas. Em seguida foram distribuídos 100 μ L de caldo TSB em todas as colunas, com exceção da coluna 1. A solução contida na coluna 2 foi homogeneizada, transferindo-se em seguida, 100 μ L desta solução para a coluna 3, e assim sucessivamente até a coluna 10, obtendo desta forma a microdiluição seriada dos compostos. Depois de homogeneizada, 100 μ L da solução contida na coluna 10 foi descartada. Adicionou-se 100 μ L de inóculo em todas as colunas, com exceção da coluna 11, a qual corresponde ao controle negativo do teste. A microplaca foi devidamente vedada, homogeneizada e incubada a 35 °C.

5.5.A

5.5.B

Figura 5.5 – Procedimento geral adotado na determinação da CIM. (A) Adição de meio TSB e das soluções-mãe; (B) Adição de inóculo.

Leituras de inibição/crescimento microbiano foram executadas após 18 e 24 horas observando-se, a cada leitura, o controle de esterilidade da solução teste, coluna 11, e o controle de crescimento microbiano, coluna 12. A leitura realizada com 18 horas de incubação à 35 °C é considerada como resultado de interesse. As leituras realizadas com 24 horas são utilizadas como simples confirmação de resultados e controle de esterilidade do controle negativo (coluna 11). Na leitura foi considerada a menor concentração do composto que não apresentou crescimento microbiano visível. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Fase II

Para a realização da fase II, utilizou-se metodologia desenvolvida por TAVARES e colabores [59 – 61] a fim de intensificar a sensibilidade do método, para tanto, houve a necessidade de adaptar este método para microescala, uma vez que sua utilização foi descrita utilizando macrodiluições em tubos de ensaio.

As soluções-mãe dos compostos foram preparadas de acordo com o resultado obtido na fase I. Trabalha-se, nesse caso, com concentrações intermediárias situadas na faixa de CIM obtida na fase I, ou seja, a coluna 1 deve apresentar concentração próxima ao valor mais alto da faixa da CIM determinada na fase I e a coluna 10 deve apresentar concentração próxima ao valor mais baixo da CIM obtida na fase I.

Parte-se inicialmente da solução com concentração equivalente a 800 µg/mL do composto em DMSO. São realizadas diluições sucessivas em meio de cultura TSB a fim de obter uma solução com concentração final equivalente a duas vezes a CIM determinada na fase I. Em seguida 1,0 mL da solução de cada composto – *concentração A* – foi transferido para uma divisória do reservatório de reagentes. Foram distribuídos 100 µL das soluções-mãe dos compostos (A – F), do fármaco de referência (G) e do controle de DMSO (H), apenas na coluna 1 da microplaca (Figura 5.6.A). Em seguida, 100 µL de caldo TSB foram adicionados nos reservatórios onde encontram-se as soluções-mãe dos compostos, diluindo-os em 10% - *concentração B* – em relação a concentração A. Após homogeneizado, 100 µL desta solução de concentração B foram adicionados na coluna 2 da microplaca

(Figura 5.6.B). Novamente, 100 μ L de caldo TSB foram adicionados nos reservatórios onde encontram-se as soluções dos compostos, diluindo-os em 10% - *concentração C* – em relação a concentração B. Após homogeneizado, 100 μ L desta solução de concentração C foram adicionados à coluna 3 da microplaca (Figura 5.6.C). Este procedimento foi repetido até a coluna 10. A mesma solução que foi transferida 100 μ L para a coluna 10 – *concentração J* – foi transferida também para a coluna 11, correspondendo ao controle negativo do ensaio. Para os controles positivo e negativo, 100 μ L de caldo TSB foram adicionados nas colunas 11 e 12. Adicionou-se 100 μ L de inóculo em todas as colunas, com exceção da coluna 11. A microplaca foi devidamente vedada, homogeneizada e incubada a 35 °C.

5.6.A

5.6.B

5.6.C

Figura 5.6 – Procedimento geral adotado para diluição dos compostos na fase II. (A) Adição de meio TSB e das soluções-mãe; (B) Primeira diluição dos compostos; (C) Segunda diluição dos compostos.

Leituras de inibição/crescimento microbiano foram executadas após 18 e 24 horas observando-se, a cada leitura, o controle de esterilidade da solução teste, coluna 11, e o

controle de crescimento microbiano, coluna 12. A leitura realizada com 18 horas de incubação à 35 °C é considerada como resultado de interesse. As leituras realizadas com 24 horas são utilizadas como simples confirmação de resultados e controle de esterilidade do controle negativo (coluna 11). Foi considerado na leitura a menor concentração do composto que não apresentou crescimento microbiano visível. Os ensaios foram realizados em triplicada.

5.3.5 Contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC)

Esta etapa do ensaio tem o objetivo de validar o teste e baseia-se em quantificar a população microbiana do inóculo utilizado no ensaio. Para esta etapa, esquematizada na figura 5.7, foram preparados e esterilizados cinco tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução fisiológica. Procedeu-se diluições sucessivas a partir de 1,0 mL do inóculo utilizado nos ensaios. A partir de cada diluição, utiliza-se 1,0 ml e distribui-se nas placas de Petri esterilizadas. Em seguida, verte-se o ágar PCA fundido e frio sobre a placa de Petri contendo a suspensão diluída do inóculo. O material é homogeneizado e após a solidificação do meio, as placas tampadas são invertidas e incubadas em estufas a 35°C durante 24 horas. Ao final da incubação, as colônias são contadas e o resultado médio de cada diluição é registrado e multiplicado pelo fator da diluição. As placas adequadas para contagem devem ter entre 30 a 300 colônias [13, 47].

Figura 5.7 – Procedimento para confecção das placas de Petri.

5.4 Resultados e Discussão

Os métodos de diluição *in vitro* detectam possível atividade antimicrobiana de compostos, utilizando métodos celulares sem alvo específico. O valor de CIM de uma determinada amostra com atividade antimicrobiana não é constante, sendo influenciada significativamente pela metodologia adotada. Dentre os fatores que podem influir nos resultados estão a natureza do microrganismo testado, a quantidade de inóculo, o tempo de incubação, a composição do meio de cultura e as condições ambientais. Quando estas condições são padronizadas, surge a possibilidade da comparação das atividades de diferentes agentes antimicrobianos frente a um certo microrganismo, sendo possível então determinar qual o agente antimicrobiano mais efetivo contra esse microrganismo, ou então, avaliar a atividade de um mesmo agente relativamente a diferentes microrganismos [8, 13, 47].

O ensaio para determinação da concentração inibitória mínima é obtido através de microdiluição que consiste em preparar diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado, em meios de cultura sólidos ou líquidos e, em seguida, verificar a menor concentração do antimicrobiano que inibiu o crescimento do microrganismo. Determina-se a CIM, como sendo a menor concentração que inibe o crescimento visível do microrganismo, figura 5.8. Este método apresenta a vantagem de ser quantitativo, podendo ser usado, tanto para amostras hidrossolúveis como lipossolúveis [64].

Figura 5.8 – Visualização do ensaio após 18 horas de incubação à 35°C.

Descritos desde 1962 [65], quando surgiu o primeiro estudo utilizando a técnica de microdiluição em sorologia e hematologia, e 1968 [66] quando foi aplicada no campo da microbiologia para os procedimentos para determinação da CIM, as técnicas de microdiluição foram desenvolvidas para economizar tempo e material [67]. Quando se utiliza desta técnica para determinar a susceptibilidade de um determinado microrganismo aos agentes antimicrobianos, a grande dificuldade se encontra em determinar com precisão o ponto final (*endpoint*) para a leitura da CIM por causa da natureza das soluções presentes no ensaio, por exemplo, quando a turvação em um poço da microplaca é proveniente da insolubilidade do agente antimicrobiano no meio de cultura, levando a uma interpretação errônea do resultado.

Uma das maneiras encontradas para contornar esta dúvida na interpretação dos resultados foi a utilização de um indicador de pH – púrpura de bromocresol¹² 0,01% – solubilizado em solução de manitol 1%. Assim, os pontos finais são determinados pela mudança da cor do indicador causada pela produção de ácido durante o crescimento bacteriano, figura 5.9.B. Este método é exato e reprodutível [67], e a adição do indicador pode ser feita tanto antes do período de incubação da placa, adicionando ao caldo TSB as concentrações de indicador e açúcar necessárias, quanto depois, apenas adicionando a

¹² Púrpura de bromocresol – Labsynth Produtos Químicos para Laboratório; pH 5,2 – 6,8;

solução de indicador às microplacas. Esta modificação elimina a necessidade de plaqueamento para confirmação dos resultados e facilita a leitura da faixa de CIM.

Figura 5.9 – Visualização da microplaca após o período de incubação. (A) Microplaca sem adição de indicador; (B) Microplaca após a adição de 50 μ L de solução de púrpura de bromocresol – coloração violeta indica os poços onde não houve o crescimento bacteriano, e a coloração amarela indica os poços onde houve o crescimento bacteriano.

Os ensaios foram realizados em triplicata na fase I e na fase II, com o objetivo de aumentar a confiabilidade dos resultados. Devido a baixa solubilidade dos compostos apresentada nos meios de cultura, foi necessário o uso de DMSO como solvente, porém não ultrapassando 12,5% de concentração inicial, pois estudos realizados anteriormente demonstraram que acima desta concentração este solvente inibe o crescimento da bactéria em estudo [59]. Cita-se que em todos os ensaios foram realizados testes apenas com solvente nas quantidades usadas nas amostras, sendo que a concentração inicial de DMSO utilizada não ultrapassou a faixa de 10% nos casos em que foi necessário utilizar altas concentrações deste solvente. Todos os compostos sintetizados foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana frente a cepa padrão ATCC25923 e multirresistentes 3SP/R33 e VISA3 de *S. aureus*. Apresenta-se na tabela 5.1, a seguir, as CIM dos derivados benzofuroxânicos frente a cepa padrão ATCC25923, e na tabela 5.2, as CIM dos derivados benzofuroxânicos frente as cepas multirresistentes 3SP/R33 e VISA3.

Tabela 5.1 – Concentração inibitória mínima, CIM, de derivados benzofuroxânicos frente a *Staphylococcus aureus*, cepa padrão ATCC25923.

	R ₁	R ₂	R ₃	ATCC25923 - MIC µg/mL	
				fase I ^a	fase II ^a
7a	H	H	H	20,0 – 10,0	18,0 – 16,2
7b	CH ₃	H	H	40,0 – 20,0	23,3 – 21,0
7c	NH ₂	H	H	20,0 – 10,0	17,0 – 15,3
7d	OH	H	H	40,0 – 20,0	29,1 – 26,2
7e	F	H	H	20,0 – 10,0	16,2 – 15,3
7f	CN	H	H	40,0 – 20,0	29,1 – 26,2
7g	CH ₂ CH ₃ ^b	H	H	> 40,0	–
7h	OCH ₃	H	H	20,0 – 10,0	18,0 – 16,2
7i	Cl	H	H	20,0 – 10,0	17,0 – 15,3
7j	COCH ₃	H	H	40,0 – 20,0	23,6 – 21,2
7k	N(CH ₃) ₂ ^b	H	H	> 80,0	–
7l	OCH ₂ CH ₃ ^b	H	H	> 40,0	–
7m	NO ₂	H	H	30,0 – 15,0	24,3 – 21,9
7n	CF ₃	H	H	20,0 – 10,0	14,6 – 13,1
7o	Br	H	H	20,0 – 10,0	20,0 – 18,0
7p	SO ₂ NH ₂ ^b	H	H	> 80,0	–
7q	I	H	H	40,0 – 20,0	26,2 – 23,6
7r	Cl	H	Cl	30,0 – 15,0	27,0 – 24,3
7s	Cl	Cl	H	15,0 – 7,5	13,1 – 11,8
7t	NO ₂	CF ₃	H	15,0 – 7,5	11,4 – 10,3
ampicilina				0,2 – 0,1	
cloranfenicol				4,0 – 2,0	
vancomicina				1,0 – 0,5	
DMSO (%)				20,0 – 10,0	12,5 – 11,0

a: testes realizados em triplicata;

b: não apresentou atividade nas condições de solubilidade permitidas pelo ensaio.

Tabela 5.2 – Concentração inibitória mínima, CIM, de derivados benzofuroxânicos frente a *Staphylococcus aureus*, cepas multirresistentes 3SP/R33 e VISA3.

	R ₁	R ₂	R ₃	3SP/R33 - MIC µg/mL		VISA3 - MIC µg/mL	
				fase I ^a	fase II ^a	fase I ^a	fase II ^a
7a	H	H	H	20,0 – 10,0	18,0 – 16,2	20,0 – 10,0	18,0 – 16,2
7b	CH ₃	H	H	40,0 – 20,0	23,3 – 21,0	40,0 – 20,0	23,3 – 21,0
7c	NH ₂	H	H	20,0 – 10,0	17,0 – 15,3	20,0 – 10,0	17,0 – 15,3
7d	OH	H	H	40,0 – 20,0	29,1 – 26,2	40,0 – 20,0	29,1 – 26,2
7e	F	H	H	20,0 – 10,0	16,2 – 15,3	20,0 – 10,0	16,2 – 15,3
7f	CN	H	H	40,0 – 20,0	29,1 – 26,2	40,0 – 20,0	29,1 – 26,2
7g	CH ₂ CH ₃ ^b	H	H	> 40,0	–	> 40,0	–
7h	OCH ₃	H	H	20,0 – 10,0	18,0 – 16,2	20,0 – 10,0	18,0 – 16,2
7i	Cl	H	H	20,0 – 10,0	17,0 – 15,3	20,0 – 10,0	17,0 – 15,3
7j	COCH ₃	H	H	40,0 – 20,0	23,6 – 21,2	40,0 – 20,0	23,6 – 21,2
7k	N(CH ₃) ₂ ^b	H	H	> 80,0	–	> 80,0	–
7l	OCH ₂ CH ₃ ^b	H	H	> 40,0	–	> 40,0	–
7m	NO ₂	H	H	30,0 – 15,0	24,3 – 21,9	30,0 – 15,0	24,3 – 21,9
7n	CF ₃	H	H	20,0 – 10,0	14,6 – 13,1	20,0 – 10,0	14,6 – 13,1
7o	Br	H	H	20,0 – 10,0	20,0 – 18,0	20,0 – 10,0	20,0 – 18,0
7p	SO ₂ NH ₂ ^b	H	H	> 80,0	–	> 80,0	–
7q	I	H	H	40,0 – 20,0	26,2 – 23,6	40,0 – 20,0	26,2 – 23,6
7r	Cl	H	Cl	30,0 – 15,0	19,7 – 17,7	30,0 – 15,0	19,7 – 17,7
7s	Cl	Cl	H	15,0 – 7,5	13,1 – 11,8	15,0 – 7,5	13,1 – 11,8
7t	NO ₂	CF ₃	H	15,0 – 7,5	12,7 – 11,4	15,0 – 7,5	12,7 – 11,4
ampicilina				32,0 – 16,0		32,0 – 16,0	
cloranfenicol				64,0 – 32,0		64,0 – 32,0	
vancomicina				1,0 – 0,5		8,0 – 4,0	
DMSO (%)				20,0 – 10,0		20,0 – 10,0	

a: testes realizados em triplicata;

b: não apresentou atividade nas condições de solubilidade permitidas pelo ensaio.

A escolha destas duas cepas se deve ao fato de apresentarem resistência a dezenove antibióticos utilizados na terapêutica atual para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, diferindo apenas na sensibilidade diante a vancomicina. A cepa 3SP/R33 é sensível a vancomicina ($\text{MIC} \leq 2 \mu\text{g/mL}$), e resistente a amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, cefazolina, cefotaxima, cefalotina, ciprofloxacino, clindamicina, eritromicina, gentamicina, imipinem, nitrofurantoína, norfloxacino, oxacilina, penicilina, rifampicina e trimetropima/sulfametoxazol [62], e a cepa VISA3 apresenta resistência intermediária a vancomicina ($\text{MIC} \geq 4 \mu\text{g/mL}$), além da resistência a oxacilina [63].

Os compostos que apresentaram os melhores pontos finais de CIM foram os compostos dissustituídos 4-nitro-3-(trifluorometil)-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7t**) ($\text{CIM} \leq 12,7 \mu\text{g/mL}$) e 3,4-dicloro-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7s**) ($\text{CIM} \leq 13,1 \mu\text{g/mL}$), além do derivado monosustituído 4-trifluorometil-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7n**) ($\text{CIM} \leq 14,6 \mu\text{g/mL}$). Por outro lado, as menores atividades foram apresentadas pelos compostos 4-hidroxi-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7d**) e 4-ciano-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7f**), ambos com pontos finais de $\text{CIM} \leq 29,1 \mu\text{g/mL}$.

Os compostos 4-dimetilamino-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7k**) e 4-sulfamoil-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7p**) não apresentaram atividade nas concentrações testadas ($\leq 80,00 \mu\text{g/mL}$), e, o aumento desta concentração promoveu a precipitação dos compostos ainda na fase de preparo das soluções-mãe, sendo também, descartada a hipótese de aumentar as concentrações de DMSO para facilitar na solubilização. O mesmo foi observado para os compostos 4-etil-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7g**) e 4-etóxi-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7l**), porém em concentrações ainda menores ($\leq 40,00 \mu\text{g/mL}$).

A atividade dos dezesseis compostos demonstra ser influenciada pelas propriedades físico-químicas dos grupos substituintes. Nota-se que a hidrofobicidade está diretamente relacionada com os compostos de maiores atividades, em concordância com outros estudos previamente realizados em derivados análogos a nifuroxazida [59, 60, 68]. Esta propriedade está relacionada com a habilidade dos compostos de atravessarem as membranas biológicas e atuarem em seu sítio receptor. A presença de grupos substituintes

com caráter hidrofóbico, tais como -F (**7e**), -Cl (**7i**, **7s**), -CF₃ (**7n**, **7t**) e -Br (**7o**), confere influência positiva à atividade dos compostos. A fim de esclarecer e aprofundar com maiores detalhes a influência dos grupos substituintes na atividade dos compostos, estudos de QSAR-2D/3D serão discutidos posteriormente neste trabalho.

5.5 Conclusões

O método de microdiluição adotado neste estudo mostrou-se reprodutível e de rápida execução. Foi possível determinar a atividade de oito compostos por ensaio, resultando em ganho expressível de tempo. A adoção de um indicador de pH facilitou a leitura dos resultados, o que também resultou em ganho de tempo, pois descarta a necessidade do plaqueamento para confirmação da inibição do crescimento microbiano, o que acrescentaria mais 24 horas no tempo de ensaio. Todos estes fatores aliados, resultam não apenas na economia de tempo, mas também de material, pois o uso de microdiluições depende pequenas quantidades quando comparados aos testes realizados em tubos de ensaio. O mesmo pode ser dito ao uso de inóculo, que pelo método de microdiluição pode ser utilizado para realizar o ensaio em nove microplacas por vez.

Todos os vinte compostos previamente sintetizados foram testados frente às cepas padrão e multirresistentes de *S. aureus*, e dezesseis destes compostos apresentaram fraca atividade antimicrobiana. O composto 4-nitro-3-(trifluorometil)-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7t**) apresentou melhor atividade (CIM ≤ 12,7 µg/mL), mas também ainda baixa, quando se considera a condição de fármaco, mas que pode ser utilizado na condição de composto-protótipo para um novo estudo de modificação molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] JAGUSZTYN-KRYNICKA, E.K., WYSZYŃSKA, A. The decline of antibiotic era-new approaches for antibacterial drug discovery. *Pol J Microbiol.* 57, 91 – 98, **2008**.
- [2] ALANIS, A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res.* 36, 697–705, **2005**.
- [3] NORMARK, B.H., NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. *J Intern Med.* Oxford, 91 – 106, **2002**.
- [4] ALANIS, A.J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res.* **36**, 697–705, **2005**. *Apud* LEVY, S.B. From tragedy the antibiotic era is born. In: LEVY, S.B. ed. The antibiotic paradox: How the misuse of antibiotics destroys their curative powers. Cambridge:Perseus Publishing. **2002**. 1 – 14.
- [5] HANCOCK, R.E.W. The end of an era? *Nat Rev Drug Discovery.* 6, 28, **2007**.
- [6] PINHO, A. 24 pessoas já morreram no Estado de São Paulo com superbactéria KPC. Folha de São Paulo, 23 out. **2010**.
- [7] LEVY, S.B., MARSHALL, B. Antimicrobial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* 10, S122 – S129, **2004**.
- [8] TRABULSI, L.R. Microbiologia. 4.ed. São Paulo:Atheneu, **2005**.
- [9] BLACK, J.G. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. 4.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, **2002**.
- [10] SEFTON, A.M. Mechanisms of antimicrobial resistance:their clinical relevance in the new millennium. *Drugs*, 62, 557 – 566, **2002**.
- [11] TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* 119, S3 – S10, **2006**.

- [12] SNYDER, L., CHAMPNESS, W. Molecular genetics of bacteria. 4ed. Washington:John Wiley & Sons Ltd, **2004**.
- [13] TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. Microbiologia. 8.ed. São Paulo:Artmed editora, **2005**.
- [14] RICE, L.B. Antimicrobial Resistance in Gram-Positive Bacteria. *Am J Med.* 119, S11 – S19, **2006**.
- [15] KLUYTMANS, J.A., WERTHEIM, H.F. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections, *Infection* 33, 3 – 8, **2005**.
- [16] KLUYTMANS, J., VAN BELKUM, A., VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Reviews.* 10, 505 – 520, **1997**.
- [17] KLOSS, W.E., BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus e micrococcus*. In: MURRAY, P.R., BARON, E., PFALLER, M.A., TENOVER, F.C., YOLKEN, R.H., eds. Manual of clinical microbiology. 8.ed. Washington:American Society for Microbiology, **2003**. p.264-282.
- [18] KONEMAN, E.W. Diagnóstico microbiológico. 5.ed. Rio de Janeiro:MEDSCI, **2001**.
- [19] CHAMBERS, H.F., DELEO, F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Rev Microbiol.* 7, 629 – 641, **2009**.
- [20] MILLER, L.G., DIEP, B.A. Clinical practice: colonization, fomites and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 46, 752 – 760, **2008**.
- [21] TANG, Y.W., STRATTON, C.W. *Staphylococcus aureus*: An Old Pathogen with New Weapons. *Clin Lab Med.* 30, 179 – 208, **2010**.
- [22] DEURENBERG, R.H., STOBBERINGH, E.E. The Molecular Evolution of Hospital and Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Mol Med.* 9, 100 – 115, **2009**.

[23] SPIANDORELLO, W.P., MORSH, F., SEBBEN, S., SPIANDORELLO, F.S.A. A resistência do *Staphylococcus aureus* à oxacilina em hospital de Caxias do Sul. *AMRIGS*. 44, 120 – 125, **2000**.

[24] MAYHALL, C.G. Hospital epidemiology and infection control. 2.ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **1999**.

[25] ITO, T., HIRAMATSU, K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J*. 39, 526 – 533, **1998**.

[26] SAXENA, S., GOMBER, C. Surmounting antimicrobial resistance in the millennium superbug: *Staphylococcus aureus*. *Cent Eur J Med*. 5, 12 – 29, **2010**.

[27] MANDELL, G.L., PETRI, W.A. Jr. Penicilinas, cefalosporinas e outro antibióticos β -lactâmicos. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G., eds. Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica. 9.ed. New York:McGraw-Hill, **1996**. p.790-811.

[28] KIRBY, W.M.M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant *Staphylococci*. *Science*, 99, 452 – 453, **1944**.

[29] GOMES, A.R., WEST, H., LENCASTRE, H. de. Origins and Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Lineages. *Antimicrob Agents Chemother*. 50, 3237 – 3244, **2006**.

[30] ENRIGHT, M.C., ASHLEY, R.D., RANDLE, G., FEIL, E. J., GRUNDMANN, H., SPRATT, B.G. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *PNAS*. 99, 7687 – 7692, **2002**.

[31] JEVONS, M.P. “Celbenin”-resistant staphylococci. *Br Med J*. 1, 124 – 125, **1961**.

[32] CARVALHO, K.S., MAMIZUKA, E.M., GONTIJO FILHO, P.P. Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 14, 71 – 76, **2010**.

[33] KIM, J. Understanding the Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Newsl*. 31, 17 – 23, **2009**.

- [34] DAUM, R.S., ITO, T., HIRAMATSU, K., HUSSAIN, F., MONGKOLRATTANOTHAI, K., JAMKLANG, M., BOYLE-VAVRA, S. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis.* 186, 1344 – 1347, **2002**.
- [35] LOPES, H.V. CA_MRSA: um novo problema para o infectologista. *Rev Panam Infectol*, 7, 34 – 36, **2005**.
- [36] RIBEIRO, J., BOYCE, J.M., ZANCANARO, P.Q. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among patients visiting the emergency room at a tertiary hospital in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 9, 52 – 55, **2005**.
- [37] VAN DE GRIEND, P., HERWALDT, L. A., ALVIS, B., DEMARTINO, M., HEILMANN, K., DOERN, G., WINOKUR, P., VONSTEIN, D.D., DIEKEMA, D. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Iowa, USA. *Emerg Infect Dis.* 15, 1582 – 1589, **2009**.
- [38] RYBAK, M.J., LA PLANTE, K.L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A Review. *Pharmacotherapy.* 25, 74 – 85, **2005**.
- [39] PALAVECINO, E. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Lab Med.* 24, 403 – 418, **2004**.
- [40] KLUYTMANS-VANDENBERGH, M.F., KLUYTMANS, J.A. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. *Clin Microbiol Infect Dis.* 12, 9 – 15, **2006**.
- [41] HIRAMATSU, K., Reduced susceptibility of *Staphylococcus aureus* to vancomycin — Japan 1996. *Morb Mortal Wkly Rep.* 27, 624 – 626, **1997**.
- [42] HIRAMATSU, K., Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance, *Lancet Infect. Dis.* 1, 147 – 155, **2001**.
- [43] OLIVEIRA, G.A., DELL'AQUILA, A.M., MASIERO, R.L., LEVY, C.E., GOMES, M.S., CUI, L., HIRAMATSU, K., MAMIZUKA, E.M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect Control Hos. Epidemiol.* 22, 443 – 448, **2001**.

- [44] CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United States, 2002. *MMWR*, 51, 565 – 567, **2002**.
- [45] CHANG, S., SIEVERT, D.M., HAGEMAN, J.C., BOULTON, M.L., TENOVER, F.C., DOWNES, F.P., SHAH, S., RUDRIK, J.T., PUPP, G.R., BROWN, W.J., CARDO, D., FRIDKIN, S.K. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med*. 348, 1342 – 1347, **2003**.
- [46] PALAZZO, I.C.V., ARAUJO, M.L.C, DARINI, A.L.C. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carrier in Brazil. *J Clin Microbiol*. 43, 179 – 185, **2005**.
- [47] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth international supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S16. 26, **2006**.
- [48] GOULD, I.M. Clinical relevance of increasing glycopeptide MICs against *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 31, 1 – 9, **2008**.
- [49] CHAMBERS, H.F., SANDE, M.A. Os *aminoglicosídeos*. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., GILMAN, A.G., eds. Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica. 9.ed., New York:McGraw-Hill, **1996**. p. 812 – 825.
- [50] SANTOS, A.L., SANTOS, D.O., FREITAS, C.C., FERREIRA, B.L.A., AFONSO, I.F., RODRIGUES, C.R., CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Bras Patol Med Lab*. 43, 413 – 423, **2007**.
- [51] NORRBY, S., NORD, C., FINCH, R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect Dis*. 5, 115 – 119, **2005**.
- [52] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.44, de 26/10/2010. D.O.U. – Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 28/10/2010.
- [53] MULLER-SERIEYS, C., DECRE, D., BENOIT, C., BIGOT, C., MAUBERT, B., CARBON, C. Levofloxacin:serum bactericidal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 43, 67 – 70, **1999**.

- [54] SHETTY, N., WILSON, P.R WILSON, P.R Sitafloracin in the treatment of patients with infections caused by vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 46, 633 – 637, **2000**.
- [55] DAILEY, C.F., DILETO-FANG, C.L., BUCHANAN, L.V., ORAMAS-SHIREY, M.P., BATTS, D.H., FORD, C.W., GIBSON, J.K. Efficacy of linezolid in treatment of experimental endocarditis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 2304 – 2308, **2001**.
- [56] WILSON, P., ANDREWS, J.A., CHARLESWORTH, R., WALESBY, R., SINGER, M., FARREL, D.J., ROBBINS, M. Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 51, 186 – 188, **2003**.
- [57] ROSE, W.E., RYBAK, M.J. Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy.* 26, 1099 – 1110, **2006**.
- [58] CARON, W.P., MOUSA, S.A. Prevention strategies for antimicrobial resistance: a systematic review of the literature. *Infection and Drug Resistance.* 3, 25 – 33, **2010**.
- [59] TAVARES, L.C., PENNA, T.C.V., AMARAL, A.T. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs I. *Boll Quim Farm.* 136, 244 – 249, **1997**.
- [60] TAVARES, L.C., CHISTÉ, J.J., SANTOS, M.G.B., PENNA, T.C.V. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs II. *Boll Chim Farm.* 138, 432 – 436. **1999**.
- [61] TAVARES, L.C. Relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade antimicrobiana de análogos à Nifuroxazida. São Paulo, **1993**. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).
- [62] OLIVEIRA, G.A. Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de diferentes regiões do Brasil baseada em métodos genotípicos e fenotípicos. São Paulo, **1998**. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- [63] OLIVEIRA, G.A. Caracterização de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina isoladas no Brasil. São Paulo, **2002** (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).

[64] COLLINS, C.H., LYNE, P.M., GRANGE, J.M., FALKINHAM, J.O. Collins and Lyne's Microbiological Methods. 8.ed. Oxford:Hodder Arnold Publication, **2004**.

[65] SEVER, J.L. Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J Immunol.* 88, 320 – 329, **1962**.

[66] HARWICK, H.J., WEISS, P., FEKETTY JR, F.R. Application of microtitration techniques to bacteriostatic and bactericidal antibiotic susceptibility testing. *J Lab Clin Med.* 72, 511 – 516, **1968**.

[67] TIPPETT, L.O., ZELEZNICK, L.D., ROBB, C.A. Modification of the microtiter technique for antimicrobial drug susceptibility testing by incorporation of indicators. *Appl Microbiol.* 20, 342 – 345, **1970**.

[68] MASUNARI, A., TAVARES, L.C. A new class of nifuroxazide analogues: synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem.* 15, 4229 – 4236, **2007**.

Determinação da atividade frente a Trypanosoma cruzi

6.1 Introdução

As doenças negligenciadas, afetam principalmente as populações pobres de países da África, Ásia e América Latina, especialmente nas áreas onde o saneamento e a moradia são precários e com pouco ou nenhum acesso aos cuidados de saúde [1]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) são estimados que 1 bilhão de pessoas, quase um sétimo da população global, padecem de uma ou mais doenças negligenciadas [2].

Os principais patógenos responsáveis, e suas respectivas doenças, fazem parte de distintas classes biológicas, e são: i) **protozoários**: *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* – malária; *Trypanosoma brucei* – tripanossomíase humana africana (doença do sono); *Trypanosoma cruzi* – Doença de Chagas; gênero *Leishmania* – leishmaniose; ii) **helmintos**: *Ascaris lumbricoides* – ascaridíase; *Trichuris trichiura* – tricuríase; *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* – ancilostomíase; gênero *Schistosoma* – esquistossomose; *Wuchereria bancrofti*, *Brugiamalayi* e *Brugia timori* – filariose (elefantíase); *Onchocerca volvulus* – oncocercose; *Dracunculus medinensis* – dracunculose; iii) **bactérias**: *Mycobacterium tuberculosis* (Bacilo de Koch) – tuberculose; *Chlamydia trachomatis* – tracoma; *Mycobacterium ulcerans* – úlcera de Buruli; *Mycobacterium leprae* – hanseníase (lepra); *Streptococcus pyogenese* – febre reumática, e, iv) **vírus**: gênero *Flavivírus* – dengue e febre amarela.

Estas doenças normalmente são caracterizadas por terem evolução lenta, e a pessoa quando é afetada por tal condição pode apresentar deformidades incapacitantes, deficiências graves e/ou morte lenta [1]. Para avaliar o impacto destas doenças, utiliza-se o estudo de carga global da doença, cujo indicador "anos de vida perdidos ajustados por incapacidade" (DALY, *Disability-Adjusted Life Years*) mensura os componentes de morbidade e mortalidade de cada doença, e considera os anos de vida perdidos devido à mortalidade prematura e os anos de vida vividos com a incapacidade devido à doença ou sequela [3,4], assim, um DALY representa a perda de um ano da saúde plena equivalente [4].

Um dos principais motivos porque estas doenças são assim chamadas, é porque as grandes companhias farmacêuticas não têm interesse em investir na área de pesquisa, desenvolvimento e inovação (P,D&I), uma vez que os investimentos não se reverterem em lucros [5]. O último estudo sobre o financiamento mundial de inovação para doenças negligenciadas realizados pelo G-FINDER (*Global Funding of Innovation for Neglected Diseases*) em 2009, demonstra que no ano de 2008 foram investidos US\$ 2,96 bilhões em P,D&I (incluídos em P,D&I estão: desenvolvimento de novos fármacos, vacinas, controle de vetores, diagnósticos e pesquisa em plataformas tecnológicas) [6]. Os investimentos provém, principalmente, do setor público de países desenvolvidos, assim como de países em desenvolvimento, entidades filantrópicas e, também, aquelas sem fins lucrativos (figura 6.1) [6]. Dentre os investidores provenientes do setor público, que totalizaram US\$ 1,96 bilhões, o governo brasileiro figura na 4ª posição, com cifras em torno de US\$ 39,48 milhões (2,0%), atrás dos Estados Unidos que investiram US\$ 1,30 bilhões (67,2%), da União Européia com US\$145,65 milhões (6,9%) e do Reino Unido com US\$ 102,60 milhões (5,5%) investidos [6].

Figura 6.1 – Fundos de investimentos em P,D&I para doenças negligenciadas [6].

Do total do investimento global, aproximadamente $\frac{3}{4}$ (72,8%) foram destinados a P,D&I para AIDS, malária e tuberculose. A maioria das outras doenças negligenciadas receberam entre 1% e 5%, tais como as doenças causadas por tripanosomatídeos (leishmania, Doença de Chagas e Doença do Sono), dengue, meningite e doenças causadas por helmintos, enquanto que, lepra, febre reumática, tracoma e úlcera de Buruli receberam menos de 0,3% cada [6].

Figura 6.2 – Investimentos em P,D&I para doenças negligenciadas [6].

Frente ao exposto, pode-se observar que existe subdivisão entre as doenças negligenciadas, apontando para a necessidade premente de se ampliar os esforços em pesquisa para as doenças que recebem menos investimentos, nas quais a Doença de Chagas está incluída. Esta parasitose é endêmica em 21 países da América Latina e responsável pela morte de cerca de 14 mil pessoas anualmente, índices maiores do que qualquer outra doença transmissível vetorialmente, incluindo a malária, além do fato de ser responsável por 667 mil DALYs [6].

A Doença de Chagas foi descoberta em 1909 pelo médico sanitaria brasileiro Carlos Chagas [7]. Em seu trabalho, intitulado “*Nova triponomiaze humana*” Carlos Chagas descreve o agente causal, sua morfologia e ciclo de vida, o inseto vetor, além de estudos clínicos realizados durante sua pesquisa, dentre outras importantes considerações.

O agente etiológico da Doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, o qual é transmitido para o homem e para mais de 150 espécies de mamíferos (**hospedeiros vertebrados**), principalmente, através do repasto sanguíneo de insetos triatomíneos (**hospedeiros invertebrados**), dentre os quais citam-se *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius prolixus* [8].

A distribuição destes vetores assim como dos reservatórios silvestres de *T. cruzi* nas Américas estendem-se desde os Estados Unidos à Argentina e ao Chile [9 - 11]. A política de controle de vetores tem demonstrado ser, ao longo das últimas décadas, uma estratégia bem sucedida na prevenção de novos casos desta parasitose [12]. No Brasil, por exemplo, esta prática reduziu a incidência de novos casos, que em 1980 eram da ordem de 100 mil para menos de 500 casos notificados por ano, a partir de 2001 – 2006 [12]. Por estes esforços, além do Brasil, Uruguai e Chile receberam a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)/OMS [12, 13].

As outras **formas de contaminação** além da transmissão vetorial são por via transfusão de sangue, por via congênita, por via oral, e as menos comuns envolvendo os acidentes de laboratório, o manejo de animais infectados, transplante de órgãos e via leite materno [13].

As vias de **transmissão transfusional** e **congênita** são as principais vias de contágio em países endêmicos nos quais o controle de vetores é monitorado e em países não-endêmicos, principalmente Estados Unidos, Canadá e países da Europa, nos quais o fluxo de imigrantes latino-americanos é alto [8, 10].

A **transmissão oral** é geralmente responsável por surtos regionais, *microepidemias*, de infecção aguda em áreas desprovidas ou não de insetos-vetores. A ingestão de água e alimentos contaminados, como caldo de cana, suco de açaí ou carne crua é, geralmente, associada à infestação parasitária em massa, resultando em casos mais graves e com alta taxa de mortalidade [8, 14].

O caso mais recente notificado, foi um surto em uma escola municipal de Chacao, na região metropolitana de Caracas, Venezuela, onde 128 pessoas foram infectadas e 1 morreu

após a ingestão de suco de fruta contaminado. Constataram que na casa onde se preparava o suco de fruta havia insetos triatomíneos nas redondezas [15].

No Brasil, os casos mais recentes aconteceram em 2005, onde 25 casos de contaminação foram confirmados, dos quais 3 levaram à morte, após a ingestão de caldo de cana contaminado na cidade de Navegantes, no Estado de Santa Catarina. Em 2006, 94 casos foram relatados em estados da região norte e nordeste do Brasil, com 6 casos levando a óbito, sendo que todos foram associados ao consumo de caldo de cana ou de açaí contaminados. No Pará, foram reportados 17 casos com 1 óbito, associados a ingestão de Bacaba (açaí branco). Em 2007, 88 casos e 4 mortes foram relatados na região amazônica, transmitidos oralmente [15].

Os dados mais atualizados estimam que existam de 8 a 15 milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* nos países endêmicos (figura 6.3) [8, 10], com incidência de transmissão vetorial de 40 mil casos por ano e de transmissão congênita superior a 14 mil casos anuais. Estes números refletem aproximadamente 2 milhões de mulheres que se encontram na idade fértil infectadas e aproximadamente 30 milhões de pessoas em situação de risco nas áreas endêmicas, uma vez que a prevalência de sangue infectado em bancos de sangue é de 1,28% [12]. Além disso, há centenas de milhares de indivíduos infectados espalhados pelo mundo, como resultado das migrações de regiões endêmicas para regiões não-endêmicas, tais como, América do Norte (Estados Unidos e Canadá), a região do Pacífico oeste (principalmente Japão e Austrália) e mais recentemente, Europa (principalmente Bélgica, Espanha, França, Itália, Reino Unido e Suíça, além de Alemanha, Áustria, Croácia, Dinamarca, Holanda, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Romênia e Suécia) [16]. Estima-se que o número de indivíduos infectados com *T. cruzi* sejam superiores a 300 mil nos Estados Unidos, >5.500 no Canadá, >80.000 na Europa e na região do Pacífico oeste, >3.000 no Japão e >1.500 na Austrália [9].

Figura 6.3 – Países endêmicos e estimativa do número de pessoas infectadas com *Trypanosoma cruzi* em países não – endêmicos.

[Reproduzido a partir de *The Lancet*, 375, Rassi JR, A.; Rassi A.; Marin-Neto, J.M, Chagas Disease, 1388–1402, Copyright (2010), com permissão de Elsevier.]

O *T. cruzi* apresenta três formas morfológicas: i) **tripomastigota**: é a forma infectante do parasita, encontrada tanto no hospedeiro invertebrado quanto no hospedeiro vertebrado. Possui forma alongada, com cinetoplasto arredondado e flagelo [17]; ii) **amastigota**: encontrada no citoplasma das células dos hospedeiros vertebrados. Possui forma arredondada, com cinetoplasto em forma de barra, flagelo curto (não visível ao microscópio óptico) [17]; e iii) **epimastigota**: encontrada no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado [17], e uma pequena quantidade (menor que 1%) nas células infectadas do hospedeiro vertebrado [18]. Possui forma alongada, com cinetoplasto em forma de barra e flagelo [17]. As formas epimastigotas podem ser cultivadas em meio axênico e dependendo das condições do cultivo, certa proporção das formas epimastigotas transformam-se em tripomastigotas [19].

O ciclo de vida do parasita é complexo e dependente dos dois hospedeiros para o seu desenvolvimento, ilustrado na figura 6.4 [8].

Figura 6.4 – Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.

[Reproduzido a partir de *The Lancet*, 375, Rassi JR, A.; Rassi A.; Marin-Neto, J.M, Chagas Disease, 1388–1402, Copyright (2010), com permissão de Elsevier.]

A doença é caracterizada por apresentar duas fases. Após a picada do inseto-vetor, acontece a inflamação da região, caracterizando os sinais de porta entrada que podem ser oculares, **sinal de Romaña**, ou cutâneos, **chagoma de inoculação** [20].

A **fase aguda**, caracteriza-se por ser geralmente assintomática, muitas vezes limitada ao estado febril [8,21]. As ocorrências de óbitos nesta fase são menores do que 10% dos casos, como consequência de miocardites e meningoencefalites, ou ambas [8, 20]. A fase aguda perdura por 4 a 8 semanas, e todas as células nucleadas do hospedeiro

vertebrado tornam-se alvos potenciais para a infecção [8]. Uma vez que a resposta imune seja estabelecida, os índices de parasitemia decaem, indicando o fim desta fase [8].

Na maioria dos casos, cerca de 60 – 70%, a doença evolui para um estágio sem manifestações clínicas, denominado **fase crônica indeterminada**, e que pode perdurar até o resto da vida do indivíduo, sendo que a presença da doença é demonstrada apenas em testes de laboratório [8,20]. A reativação da parasitemia pode ocorrer em indivíduos imunocomprometidos ou nos que fazem uso de fármacos imunossupressores [8].

Nos outros casos, 30 – 40%, os indivíduos irão desenvolver as formas crônicas sintomáticas da doença: a **fase crônica digestiva** apresentando alargamento no esôfago (megaesôfago) e no intestino (megacólon), a **fase crônica cardíaca** apresentando alterações na função cardíaca, tais como, batimentos cardíacos descompassados (arritmias) e cardiomiopatias [8, 20, 21].

Variações intraespecíficas nas linhagens de *T. cruzi* podem ser consideradas como razões para explicar a variabilidade nas manifestações clínicas da doença [22]. A classificação das cepas de acordo com o seu comportamento biológico em animais experimentais, agrupa as diferentes linhagens em três tipos, considerando a morfologia, virulência, patogenicidade, tropismo tecidual, pico de parasitemia e amplitude da curva de parasitemia [22 – 26]. O **Tipo I** é constituído de formas delgadas com tropismo pelo tecido intersticial na fase aguda e de formas delgadas com tropismo pelo tecido muscular na fase crônica. Multiplicam-se rapidamente, apresentando alta parasitemia e pico parasitêmico em torno de 10 dias, e a mortalidade dos animais evoluem para óbito entre 7 e 12 dias. As cepas Y, Tulahuen e Peruana são exemplos desta linhagem [22, 23]. O **Tipo II** é constituído de formas largas com tropismo pelo tecido muscular cardíaco em ambas as fases da infecção. A multiplicação é relativamente lenta com picos irregulares entre o 12º e 20º dia da infecção [22, 24], e a mortalidade durante este período é máxima. As cepas São Felipe e Berenice são exemplos de Tipo II [22]. O **Tipo III** é constituído de formas largas com miotropismo predominante durante ambas as fases e picos de parasitemia entre os dias 20 e 30 após o início da infecção. Apresenta baixa taxa de mortalidade que acontece apenas 50 dias após a infecção. A cepa Colombiana é exemplo desta linhagem [22, 23, 25].

Desde a década de 70, o tratamento clínico da Doença de Chagas é dependente de apenas dois fármacos (figura 6.5): o **benznidazol** (BZN, *N*-benzil-2-nitro-1-imidazol-

acetamida, Rochagan®, Roche, produzido atualmente pelo LAFEPE, Brasil) e o **nifurtimox** (NFX, 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideno-amino)-tetraidro-4-hidrogeno-1,4-tiazina-1,1-dióxido, Lampit®, Roche). Acredita-se que semelhantemente a outros nitrocompostos, BZN e NFX exerçam a sua atividade biológica através da biorredução do grupo nitro [27, 28].

Figura 6.5 – Estrutura química dos fármacos atualmente empregados no tratamento da Doença de Chagas.

Apesar destas poucas alternativas de tratamento, alguns motivos apresentados por CASTRO e SOLEIRO [29] desqualificam estes fármacos como ideais para o tratamento da Doença de Chagas são: *i*) apresentam sérios efeitos colaterais: dentre os efeitos tóxicos resultantes do uso do nifurtimox destaca-se anorexia, distúrbios psíquicos e comportamentais, excitabilidade ou sonolência e alterações digestivas [30]. Dentre as reações adversas atribuídas ao uso do benznidazol estão as reações de hipersensibilidade, depressão da medula, polineuropatia e polineurite periférica [31]. Entretanto, dentre os problemas mais relevantes citam-se os comportamentos tóxicos e genotóxicos que os tornam inapropriados para o tratamento de qualquer tipo de doença [32]; *ii*) requerem administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica; *iii*) há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasita à ação destes fármacos; *iv*) populações de parasitas resistentes a ambos compostos têm sido relatadas; *v*) não são ativos durante a fase crônica da doença, onde os melhores resultados de tratamento são obtidos na fase aguda da doença, onde cerca de 60% dos indivíduos tratados são curados [33].

O problema da Doença de Chagas envolve vários fatores relacionados incluindo saúde pública, fatores científicos, econômicos, educacionais entre outros. Entretanto a necessidade mais urgente é encontrar novos fármacos para o tratamento desta doença [32].

Como visto, os dois fármacos disponíveis atualmente não são inteiramente eficazes e apresentam diversos efeitos adversos, além do que as indústrias farmacêuticas reduziram drasticamente seus investimentos no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças tropicais, pois o retorno econômico para elas é insatisfatório devido a estes programas serem voltados para países de baixa renda [34].

6.2 Objetivo

Avaliar a atividade biológica *in vitro* dos derivados benzofuroxânicos sintetizados frente as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

6.3 Materiais e Métodos

A avaliação da atividade dos compostos sintetizados foi realizada frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*, cepa Y [35], cultivadas a 28°C, em meio LIT¹ (*liver infusion tryptose*), suplementado com 10% de soro fetal bovino² v/v. Os testes foram realizados durante as duas fases de crescimento parasitário: logarítmica [36], e estacionária [37 - 46]. Apresenta-se a seguir, os procedimentos adotados para realização dos ensaios.

6.3.1 Preparo da curva de calibração

A primeira etapa dos ensaios, consiste em obter uma equação que possa relacionar a absorvância em comprimento de onda de 580nm com o número de parasitas/mL das

¹ LIT (*Liver Infusion Tryptose*) – preparado e disponibilizado pelo Laboratório de Bioquímica Parasitária/ Departamento de Bioquímica/IQ/USP; Composição (%/L): NaCl, 0,4; KCl, 0,04; Na₂HPO₄, 0,8; glicose, 0,2; triptose, 0,5; infusão de fígado, 0,5; pH final: 7,2;

² soro fetal bovino – disponibilizado pelo Laboratório de Bioquímica Parasitária/Departamento de Bioquímica/IQ/USP.

amostras. Para tanto é necessário quantificar diferentes soluções contendo os parasitas e correlacionar com sua respectiva absorvância, segundo esquema apresentado na Figura 6.6.

O processo se inicia com a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer por microscopia ótica. A partir da suspensão de parasitas incubadas a 28 °C, os mesmos foram transferidos para tubo falcon (diferentes volumes) e diluídos em meio LIT, a fim de obter uma suspensão com 2,0 mL de volume final. Uma alíquota deste inóculo diluído foi colocada na Câmara de Neubauer e a contagem foi feita em microscópio óptico utilizando aumento de 400x. A concentração de parasitas na câmara de Neubauer vai determinar se a leitura será feita nos quatro quadrantes externos ou apenas nas diagonais destes quadrantes, devido a motilidade das formas epimastigotas. Nas amostras onde havia uma concentração alta de formas parasitárias, optou-se em realizar a contagem do número de células viáveis apenas nas diagonais dos quadrantes, por outro lado, em amostras mais diluídas, a contagem se deu nos quadrantes inteiros.

Figura 6.6 – Esquema de preparo das amostras para o preparo da curva de calibração.

O número total de parasitas/mL (NP) do inóculo diluído é obtido por meio da aplicação da equação 6.1,

(Eq. 6.1)

$$\text{Número de parasitas/mL} = \text{número de parasitas contados} \times FC$$

onde:

FC = fator de correção da Camera de Neubauer. Assume-se o valor de 10000 se a leitura for realizada nas diagonais dos quadrantes externos e 2500 se a leitura for realizada nos quadrantes externos inteiros.

A equação 6.1 pode ser expandida para determinar a concentração de parasitas/mL do inóculo original, adicionando à mesma, o fator de diluição utilizado no preparo do inóculo diluído, obtendo-se assim a equação 6.2:

$$\text{Número de parasitas/mL} = \text{número de parasitas contados} \times FC \times \text{diluição} \quad (\text{Eq. 6.2})$$

Uma vez quantificados os parasitas, tanto do inóculo original, quanto dos inóculos diluídos, transfere-se 1,0 mL destas soluções para cubetas descartáveis com caminho óptico de 1 cm. Realiza-se a leitura em espectrofotômetro³, utilizando comprimento de onda de 580 nm a fim de obter os dados de absorvância. Plota-se os dados de absorvância obtidos com os dados da contagem de parasitas, e por regressão linear a equação 6.3 é obtida:

$$Abs = K1*(NP) + K0 \quad (\text{Eq. 6.3})$$

onde:

Abs = absorvância em 580nm (A_{580}) da amostra;

K1, K0 = coeficientes determinados por análise de regressão linear de primeira ordem;

NP = número de parasitas/mL.

³ Espectrofotômetro UV/VIS modelo T80+ – PG Instruments LTD. Inglaterra.

6.3.2 Ensaios na fase log

Preparo das soluções-mãe de compostos a serem testados

As soluções-mãe dos compostos sintetizados foram obtidas segundo esquema apresentado na Figura 6.7. Cada composto a ser testado, foi diluído em 5,0 mL de DMSO, a fim de originar solução inicial – *solução A* – de concentração equivalente a 5000 µg/mL. A partir desta solução foram preparadas outras duas soluções. Na primeira – *solução B* –, foram transferidos 0,1 mL para frasco contendo 4,9 mL de LIT de forma a originar solução de concentração equivalente a 100 µg/mL, posteriormente utilizada no ensaio. Para a segunda solução – *solução C* –, foram transferidos 2,0 mL para frasco contendo 3,0 mL de DMSO de forma a originar solução de concentração equivalente a 2000 µg/mL. A partir desta solução foram transferidos 0,1 mL para frasco contendo 4,9 mL de LIT de forma a originar solução – *solução D* – de concentração equivalente a 40 µg/mL, posteriormente utilizada no ensaio. O benznidazol, utilizado como fármaco de referência, foi preparado utilizando o mesmo procedimento e como controle de solvente, foi preparado solução de DMSO a 2% v/v em meio LIT.

Figura 6.7 – Esquema de preparo das soluções-mãe dos compostos para ensaio na fase log.

Preparo do inóculo

O preparo do inóculo de *T. cruzi* foi realizado segundo esquema apresentado na Figura 6.8. A partir da suspensão parasitária na fase logarítmica (cultura parasitária de três dias), transfere-se 1,0 mL para cubetas descartáveis e realiza-se a leitura em espectrofotômetro para determinar o número de parasitas/mL (Y) desta suspensão por aplicação da equação 3. Uma vez determinada a concentração do inóculo, transferiu-se o volume (X) necessário para se obter suspensão com concentração inicial de $2,0 \times 10^7$ parasitas/mL em 50 mL de meio LIT, que foi posteriormente utilizada no ensaio.

Figura 6.8 – Esquema de preparo do inóculo na fase log.

Determinação da atividade anti-*T. cruzi*

Para cada ensaio realizado foi utilizado caixa com 100 cubetas descartáveis, possibilitando desta forma, determinar a atividade de seis compostos e do benznidazol em triplicata a cada ensaio. O esquema utilizado na elaboração das caixas está disponível no Anexo 3, "Planilha utilizada na execução dos ensaios", e o esquema para preparo de cada cubeta está ilustrado na figura 6.9.

A partir da *solução B*, transfere-se 0,5 mL de solução para as cubetas **1** e **2**, e a partir da *solução D*, transfere-se 0,5 mL de solução para as cubetas **3** e **4**, e 0,25 mL desta mesma solução para as cubetas **5** e **6**. Este procedimento é repetido para todos os compostos. Para preparo do controle de solvente – DMSO – utilizando as mesmas concentrações que foram

utilizadas nos compostos, transfere-se 0,5 mL de solução de DMSO a 2% v/v para as cubetas **7 e 8**, e 0,25 mL desta mesma solução para as cubetas **9 e 10**. Nas cubetas onde foram colocados 0,25 mL de solução de compostos, **5 e 6**, e de solução de DMSO, **9 e 10**, adiciona-se 0,25 mL de meio LIT. Para o preparo das cubetas que serão utilizadas como controle negativo de crescimento, cubetas **2, 4, 6, 8 e 10**, assim como branco de cada concentração de amostra, transfere-se 0,5 mL de meio LIT. O meio LIT também será transferido para as cubetas **11** (0,5 mL), para preparo da cubeta contendo o controle de crescimento positivo, e para a cubeta **11** (1,0 mL), que será utilizada para zerar o equipamento. Por último, adiciona-se 0,5 mL de inóculo nas cubetas **1, 3, 5, 7, 9 e 11**, em seguida, as cubetas foram lacradas e homogeneizadas. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de UV e em seguida as cubetas foram incubadas a 28°C.

Figura 6.9 – Procedimento geral adotado para realização do ensaio.

Leituras de absorvância foram executadas após 24, 48, 72 e 96 horas observando-se, a cada leitura, o controle de esterilidade das cubetas sem inóculo, cubetas **2, 4, 6, 8, 10 e 12**.

6.3.3 Ensaios na fase estacionária

Preparo das soluções-mãe de compostos a serem testados

As soluções-mãe dos compostos sintetizados foram realizadas em duas etapas. Na primeira etapa, os compostos foram testados nas concentrações de 50, 25 e 5 μM , segundo esquema apresentado na Figura 6.10. Para cada composto a ser testado, pesou-se massa equivalente a 50 mM de acordo com sua respectiva massa molecular. Em seguida, cada composto foi diluído em 5,0 mL de DMSO, a fim de originar solução inicial – *solução A* – de concentração equivalente a 10 mM. A partir desta foram transferidos 0,1 mL para frasco contendo 4,9 mL de LIT de forma a originar solução de concentração equivalente a 200 μM – *solução B*. Transferiu-se 3,0 mL da solução *B*, para frasco contendo 3,0 mL de meio LIT, originando a *solução C* com concentração equivalente a 100 μM . Após homogeneizada, transferiu 2,0 mL da solução *C*, para frasco contendo 2,0 mL de meio LIT, originando a *solução D* com concentração equivalente a 50 μM . As soluções *C* e *D* foram posteriormente utilizadas no ensaio. O benznidazol, utilizado como fármaco de referência, foi preparado utilizando o mesmo procedimento e como controle de solvente, foi preparado solução de DMSO a 2% v/v em meio LIT.

Figura 6.10 – Esquema de preparo das soluções-mãe dos compostos para ensaio na fase estacionária.

Na segunda etapa, as concentrações utilizadas foram preparadas de acordo com os resultados obtidos na primeira etapa dos ensaios a fim de se obter a %IC₅₀ experimental dos compostos. As soluções-mãe dos compostos foram realizadas segundo esquema apresentado na Figura 6.11.

Figura 6.11 – Esquema de preparo das soluções-mãe dos compostos para obtenção de concentrações intermediárias.

Para cada composto a ser testado, pesou-se massa de acordo com as concentrações finais desejadas, demonstrada na tabela 6.1. Em seguida, cada composto foi diluído em 5,0 mL de DMSO, a fim de originar solução inicial – *solução A*. A partir desta solução, foram transferidos 0,1 mL para frasco contendo 4,9 mL de LIT de forma a originar solução *B*. Após homogeneizada, transferiu 1,0 mL da solução *B*, para frasco contendo 4,0 mL de meio LIT, originando a *solução C*. As soluções *B* e *C* foram posteriormente utilizadas no ensaio transferindo os volumes para as cubetas, **1, 2, 3 e 4**, de acordo com a figura 6.11. O benznidazol, utilizado como fármaco de referência, foi preparado utilizando o mesmo procedimento e as concentrações utilizadas nos ensaios foram de 20 e 10 μM . O controle de solvente utilizado continuou sendo a solução de DMSO a 2% v/v em meio LIT, sendo que as concentrações utilizadas nos ensaios foram de 1% e 0,5% v/v.

Tabela 6.1 – Concentrações utilizadas no preparo das soluções-mãe dos compostos.

massa pesada (mM)	solução A (mM)	solução B (μ M)	solução C (μ M)	concentrações finais nas cubetas (μ M)			
				1 ^a	2 ^b	3 ^a	4 ^b
60,0	12,0	240,0	60,0	120,0	60,0	30,0	15,0
40,0	8,0	160,0	40,0	80,0	40,0	20,0	10,0
30,0	6,0	120,0	30,0	60,0	30,0	15,0	7,5
10,0	2,0	40,0	10,0	20,0	10,0	5,0	1,0 ^c

a: concentração obtida após adição de 0,5 mL de inóculo ou 0,5 mL de meio LIT (branco);

b: concentração obtida após adição de 0,5 mL de inóculo + 0,25 mL de meio LIT ou 0,75 mL de meio LIT (branco);

c: para obter esta concentração final, transfere-se 0,10ml da *solução C* para a cubeta, adiciona-se 0,4mL de LIT + 0,5 mL do inóculo ou adiciona-se 0,9 mL de meio LIT (branco).

Preparo do inóculo

O preparo do inóculo de *T. cruzi* foi realizado da mesma maneira segundo esquema apresentado na Figura 6.8, página 174, entretanto, partiu-se da suspensão parasitária na fase estacionária (cultura parasitária de dez dias), e foi preparada suspensão com concentração inicial de $4,0 \times 10^6$ parasitas/mL em 50 mL de meio LIT, que foi posteriormente utilizada no ensaio.

Determinação da atividade anti-*T. cruzi*

O procedimento operacional abordado para a determinação da atividade anti-*T. cruzi* dos compostos na fase estacionária, seguiu o mesmo esquema realizado para a fase logarítmica, alterando apenas as concentrações dos compostos utilizados e o volume transferido para as cubetas.

Após o preparo das caixas e a devida vedação das cubetas, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (dia 0), e em seguida as cubetas foram incubadas a 28°C por 5 dias. Leituras de absorvância foram executadas após este período (dia 5) e o cálculo da

porcentagem de inibição de crescimento (%IC) foi obtido por aplicação da equação 6.4 [37 – 46]:

$$\%IC = \left(1 - \frac{A_P - A_{0P}}{A_C - A_{0C}}\right) \times 100 \quad (\text{Eq. 6.4})$$

onde:

A_P = A_{580} da cultura contendo composto no dia 5;

A_{0P} = A_{580} da cultura contendo o composto logo após adição de inóculo (dia 0);

A_C = A_{580} da cultura na ausência de qualquer composto (controle positivo);

A_{0C} = A_{580} da cultura na ausência de qualquer composto no dia 0.

6.4 Resultados e Discussão

6.4.1 Preparo da curva de calibração

Como foi referido na seção “Materiais e Métodos”, a primeira etapa dos ensaios foi a obtenção de equação que fornecesse o número de parasitas contidos em suspensão a partir de leituras de absorvância. Dessa forma, suspensões que tiveram o número de parasitas quantificado por microscopia ótica, foram avaliadas quanto à absorvância em espectroscopia de UV/visível.

O levantamento da curva foi realizado com 15 pontos ao longo da faixa de trabalho de absorvância entre 0,000 a 1,000. Foram realizadas duas leituras em microscópio e a média aritmética encontrada foi utilizada como padrão, descartando o desvio padrão da média. O motivo de descartar o desvio padrão deve-se principalmente pela alta variação encontrada quando as soluções com parasitas são quantificadas, por exemplo: aplicando a equação 6.2 para quantificar o inóculo, onde, a partir do mesmo, faz-se necessário realizar uma diluição em torno 1:50 em meio de cultura e na sequência a leitura é realizada apenas nas diagonais dos quadrantes (o que reflete em um fator de correção igual a 10.000). Desta

forma, cada parasita contado a mais ou menos em cada leitura no microscópio, refletirá uma variação de 500.000 parasitas/mL de inóculo. Uma vez que os parasitas apresentam uma rápida motilidade, os erros na leitura podem originar variações na casa dos milhões.

As correlações gráficas e estatísticas foram elaboradas a partir dos dados obtidos e processados pelo software UVWin 5.0⁴ que acompanha o equipamento de leitura. Os dados referentes à curva de calibração encontram-se na tabela 6.2. Foram preparadas duas soluções (*padrão 1A e 1B*) a partir do inóculo dos parasitas, diluindo o mesmo em 1:50 v/v em meio LIT, seguido de uma nova diluição 1:5, uma vez que não foi possível quantificar a suspensão anterior, por estar muito concentrada. A partir dessas diluições, foram realizadas subsequentes diluições 1:1 para obter as concentrações mais diluídas (*padrões 2 – 8*). As leituras foram realizadas nos quatro quadrantes externos.

O modelo linear foi utilizado para a calibração da função e o coeficiente de determinação dos dados obtido foi $r^2 = 0,9957$.

Tabela 6.2 – Dados referentes a construção da curva de calibração.

Padrão	Leituras			Concentração ^a (NP)	Abs
	1 ^a	2 ^a	média		
1A	80	72	76	47,50	0,781
1B	70	66	68	42,50	0,767
2A	51	43	47	23,50	0,430
2B	44	38	41	20,50	0,418
3A	25	23	24	12,00	0,224
3B	21	20	20,5	10,25	0,225
4A	11	13	12	6,00	0,118
4B	12	8	10	5,00	0,114
5A	7	11	9	4,50	0,099
5B	10	6	8	4,00	0,084
6A	4	6	5	2,50	0,048
6B	4	4	4	2,00	0,037
7A	2	3	2,5	1,25	0,028
7B	1	3	2	1,00	0,017
8A	0	2	1	0,50	0,010

a: epimastigotas * 10⁶/mL;

⁴ UVWin – Spectrophotometer Software, PG Instruments, v.5.0.5.

6.4.2 Ensaios na fase log

Os ensaios na fase logarítmica visam o acompanhamento diário da atividade biológica dos compostos, sendo que o número de parasitas utilizado é de $1,0 \times 10^7$ parasitas/mL iniciais e avalia, além da capacidade inibitória dos compostos, a capacidade dos mesmos de eliminarem os parasitas presentes no meio. Os ensaios foram realizados com formas epimastigotas de *T. cruzi* e são consideradas formas não-infectantes, entretanto, a presença deste tipo morfológico em células de mamíferos foi revisada e confirmada [18, 47, 48].

Os compostos foram testados em três concentrações, 10, 20 e 50 µg/mL e os resultados estão demonstrados nas tabelas 6.3 – 6.23. O benznidazol foi utilizado como fármaco de referência e os testes foram realizados nas mesmas condições e concentrações. Os resultados referentes a exposição frente a este fármaco estão demonstrados na tabela 6.24.

Os ensaios foram realizados em triplicata e nenhum dado foi descartado. Novamente foi necessário o uso de DMSO como solvente, entretanto as concentrações utilizadas para os ensaios anti-*T. cruzi* não ultrapassaram 1,0%. O uso de concentrações acima de 3,5% de DMSO promove a formação de rosáceas [49], visíveis por microscopia, as quais são caracterizadas por se apresentarem como aglomerados circulares de formas epimastigotas, com as extremidades flageladas voltadas para o centro.

Excessão foi feita para os compostos substituídos 4-H (**7a**), 4-CH₃ (**7b**), 4-NH₂ (**7c**), 4-OH (**7d**), 4-CN (**7f**), 4-CH₂CH₃ (**7g**) e 4-OCH₃ (**7h**), que precipitaram quando ensaiados em concentrações de 50 µg/mL. Desta forma, para estes seis casos, a alternativa encontrada foi utilizar 2,0% de DMSO. Em todos os ensaios foram realizados testes apenas com solvente nas quantidades usadas nas amostras 2,0%, 1,0% e 0,5%, e em nenhum momento detectou-se a redução do número de parasitas. Desta forma os resultados obtidos referem-se apenas a atividade dos compostos.

Tabela 6.3 – Número de parasitas/mL dos controles positivo e de solventes durante 96 horas.

controles	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL								
		controle positivo (CP)			DMSO 1%			DMSO 0,5%		
	0	10,53	±	1,08	10,33	±	1,00	9,84	±	0,99
	24	19,42	±	1,06	18,23	±	1,02	18,51	±	0,98
	48	29,73	±	1,45	27,94	±	1,18	28,51	±	1,42
	72	39,60	±	2,41	37,79	±	1,74	38,49	±	2,47
	96	48,45	±	2,57	47,31	±	1,78	47,13	±	3,40

Gráfico de linha mostrando o crescimento de parasitas (nº de parasitas * 10⁶ / mL) ao longo do tempo (Tempo em horas) para os controles. O controle positivo (vermelho) mostra o maior crescimento, seguido pelos solventes DMSO 1% (cinza) e DMSO 0,5% (azul). Todos os controles mostram um aumento linear no número de parasitas ao longo do tempo.

Tabela 6.4 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto *N'*-(benzofuroxan-5-il)metileno benzidrazida(**7a**).

4-H 7a	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL								
		50 µg/mL			20 µg/mL			10 µg/mL		
	0	12,44	±	0,20	10,72	±	0,71	11,38	±	0,12
	24	6,47	±	0,31	10,09	±	1,10	13,45	±	0,52
	48	3,32	±	0,59	7,84	±	1,23	16,65	±	1,61
	72	2,10	±	0,65	6,97	±	1,41	21,41	±	2,27
	96	1,85	±	0,36	6,08	±	1,31	27,44	±	3,30

Gráfico de linha mostrando o efeito de diferentes concentrações do composto **7a** (50 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL) sobre o crescimento de parasitas (nº de parasitas * 10⁶ / mL) ao longo do tempo (Tempo em horas). O controle positivo (vermelho) continua a crescer, enquanto as concentrações de 50 µg/mL (cinza), 20 µg/mL (azul) e 10 µg/mL (preto) mostram uma diminuição progressiva no número de parasitas ao longo do tempo.

Tabela 6.5 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-metil[*N'*-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7b**).

4-CH ₃ 7b	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL								
		50 µg/mL			20 µg/mL			10 µg/mL		
	0	10,15	±	0,24	10,75	±	0,29	10,33	±	0,18
	24	10,66	±	0,62	12,48	±	0,54	13,63	±	0,52
	48	9,61	±	0,52	13,20	±	0,30	19,16	±	1,32
	72	9,65	±	0,51	14,98	±	0,30	26,20	±	2,27
	96	9,30	±	0,44	17,51	±	1,71	33,01	±	1,39

Gráfico de linha mostrando o efeito de diferentes concentrações do composto **7b** (50 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL) sobre o crescimento de parasitas (nº de parasitas * 10⁶ / mL) ao longo do tempo (Tempo em horas). O controle positivo (vermelho) continua a crescer, enquanto as concentrações de 50 µg/mL (cinza), 20 µg/mL (azul) e 10 µg/mL (preto) mostram uma diminuição progressiva no número de parasitas ao longo do tempo.

Tabela 6.6 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-amino[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7c**).

4-NH ₂ 7c	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	10,62	± 1,24	11,53	± 0,12	11,43	± 0,22
	24	12,60	± 1,46	15,00	± 1,24	17,43	± 0,73
	48	16,21	± 0,72	22,43	± 1,38	26,06	± 1,54
	72	23,00	± 0,57	30,29	± 1,77	36,75	± 2,04
	96	30,53	± 0,61	39,16	± 1,95	47,31	± 1,80

Tabela 6.7 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-hidróxi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7d**).

4-OH 7d	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	11,76	± 1,55	12,62	± 0,55	11,05	± 0,54
	24	11,82	± 1,66	19,64	± 0,99	19,39	± 0,96
	48	17,10	± 1,40	29,46	± 1,32	30,54	± 1,17
	72	20,80	± 1,85	38,36	± 1,22	40,63	± 1,33
	96	28,60	± 1,90	46,49	± 1,40	48,80	± 0,87

Tabela 6.8 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-fluoro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7e**).

4-F 7e	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	11,63	± 0,84	10,99	± 0,41	10,31	± 0,41
	24	6,00	± 0,12	10,13	± 0,81	14,40	± 0,84
	48	7,57	± 0,21	8,91	± 0,88	17,62	± 2,12
	72	8,85	± 0,35	8,29	± 1,10	21,95	± 3,36
	96	9,45	± 0,26	6,04	± 0,55	27,73	± 3,17

Tabela 6.9 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-ciano[*N'*-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7f**).

4 - CN 7f	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	11,76	± 0,07	11,26	± 0,19	11,94	± 0,67
	24	13,63	± 0,58	14,38	± 0,12	18,34	± 0,87
	48	16,54	± 0,40	18,94	± 1,27	27,73	± 0,74
	72	22,12	± 0,46	24,04	± 1,37	36,37	± 0,95
	96	27,93	± 0,73	29,88	± 1,43	44,53	± 1,44

Tabela 6.10 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-etil[*N'*-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7g**).

4 - CH ₂ CH ₃ 7g	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	10,48	± 0,32	10,09	± 0,73	10,95	± 1,08
	24	9,30	± 0,50	11,88	± 0,66	14,34	± 1,06
	48	7,22	± 0,62	11,45	± 0,42	17,68	± 1,45
	72	5,94	± 0,32	9,49	± 0,12	21,04	± 2,41
	96	4,78	± 0,48	6,97	± 0,84	24,45	± 2,57

Tabela 6.11 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-metóxi[*N'*-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7h**).

4 - OCH ₃ 7h	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	11,53	± 0,96	10,97	± 0,18	10,62	± 0,47
	24	10,87	± 0,73	12,44	± 1,03	14,44	± 0,71
	48	10,06	± 0,64	12,03	± 0,73	19,14	± 1,18
	72	9,59	± 1,04	12,09	± 0,80	25,54	± 1,37
	96	9,42	± 1,38	12,71	± 0,61	31,28	± 2,48

Tabela 6.12 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-cloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7i**).

4-Cl	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
7i	0	10,47	± 0,86	10,97	± 0,76	10,37	± 0,56
	24	11,34	± 0,53	7,88	± 0,47	12,99	± 0,23
	48	13,76	± 0,74	7,82	± 0,41	14,98	± 0,50
	72	15,00	± 0,76	6,66	± 0,09	18,05	± 1,05
	96	14,63	± 0,70	6,21	± 0,39	22,01	± 0,53

Tabela 6.13 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-acetil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7j**).

4-COCH ₃	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
7j	0	11,68	± 0,53	11,01	± 0,57	10,95	± 0,52
	24	11,00	± 0,62	15,51	± 0,47	17,70	± 0,84
	48	8,78	± 0,78	20,57	± 0,58	26,33	± 0,94
	72	6,72	± 0,42	25,97	± 0,36	34,25	± 1,67
	96	5,65	± 0,17	31,46	± 0,34	42,01	± 1,62

Tabela 6.14 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-dimetilamino[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7k**).

4-N(CH ₃) ₂	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
7k	0	10,19	± 0,32	10,19	± 0,71	11,10	± 0,29
	24	16,38	± 0,50	16,63	± 1,08	18,36	± 0,54
	48	25,42	± 0,82	26,04	± 0,98	27,58	± 1,02
	72	35,51	± 1,22	36,70	± 1,38	38,13	± 1,61
	96	40,60	± 2,04	42,30	± 0,88	44,13	± 2,41

Tabela 6.15 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-etóxi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7l**).

4-OC ₂ H ₃ 7l	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	10,15	± 0,58	10,52	± 0,19	11,05	± 0,40
	24	12,09	± 0,52	12,48	± 0,07	15,24	± 0,73
	48	11,80	± 1,37	13,06	± 0,69	20,38	± 1,05
	72	13,39	± 0,45	12,83	± 0,90	26,90	± 0,80
	96	8,87	± 0,80	12,27	± 0,56	32,21	± 1,52

Tabela 6.16 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-nitro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7m**).

4-NO ₂ 7m	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	12,35	± 0,44	11,01	± 0,74	11,36	± 0,52
	24	10,64	± 0,36	11,10	± 0,34	17,26	± 1,17
	48	10,08	± 0,30	10,51	± 0,83	25,40	± 1,34
	72	10,77	± 0,47	10,57	± 0,64	34,63	± 1,20
	96	9,83	± 0,35	10,22	± 0,71	42,59	± 1,81

Tabela 6.17 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-trifluorometil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7n**).

4-CF ₃ 7n	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	10,37	± 0,31	11,22	± 0,29	10,31	± 0,35
	24	4,78	± 0,25	7,20	± 0,13	11,78	± 0,98
	48	5,98	± 0,12	6,16	± 0,15	12,62	± 1,16
	72	6,99	± 0,31	5,53	± 0,06	13,92	± 1,16
	96	7,20	± 0,26	4,78	± 0,41	16,46	± 0,41

Tabela 6.18 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-bromo[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7o**).

4-Br 7o	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	11,79	± 0,67	11,00	± 1,03	11,03	± 0,05
	24	11,94	± 0,22	10,73	± 3,40	14,66	± 1,39
	48	14,19	± 1,59	10,20	± 3,03	18,27	± 2,68
	72	16,56	± 2,28	9,52	± 2,02	22,00	± 3,36
	96	15,75	± 2,57	8,62	± 1,98	26,90	± 4,03

Tabela 6.19 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-sulfamoi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7p**).

4-SO ₂ NH ₂ 7p	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	10,46	± 0,48	10,08	± 0,76	10,75	± 0,34
	24	16,03	± 0,73	17,31	± 1,16	18,77	± 1,04
	48	25,36	± 1,14	26,35	± 1,53	27,96	± 1,40
	72	34,83	± 1,46	36,17	± 1,55	37,80	± 1,29
	96	41,57	± 1,41	43,51	± 2,86	45,04	± 2,33

Tabela 6.20 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-iodo[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7q**).

4-I 7q	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	10,68	± 0,67	10,21	± 0,39	10,77	± 1,02
	24	13,94	± 0,78	10,19	± 0,17	13,80	± 1,26
	48	15,31	± 0,81	8,41	± 0,69	15,84	± 1,54
	72	15,88	± 0,54	7,61	± 0,35	18,15	± 0,88
	96	13,04	± 0,32	6,23	± 0,82	19,54	± 1,29

Tabela 6.21 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 2,4-dicloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7r**).

2-Cl,4-Cl 7r	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	10,17	± 0,37	10,48	± 0,38	10,95	± 0,41
	24	7,88	± 0,38	12,35	± 0,66	15,41	± 0,68
	48	4,93	± 0,78	11,92	± 0,70	17,82	± 0,73
	72	4,45	± 0,12	11,12	± 0,72	23,15	± 1,38
	96	3,65	± 0,17	9,36	± 0,78	27,32	± 1,43

Tabela 6.22 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 3,4-dicloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7s**).

3-Cl,4-Cl 7s	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	10,89	± 0,67	10,66	± 0,56	10,81	± 1,16
	24	6,31	± 0,30	8,33	± 0,74	13,55	± 1,24
	48	7,98	± 0,15	7,92	± 0,51	16,19	± 1,37
	72	9,86	± 0,82	7,46	± 0,48	19,43	± 2,45
	96	9,47	± 0,35	5,94	± 0,62	23,27	± 3,40

Tabela 6.23 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto 4-nitro-3-(trifluorometil)[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7t**).

3-CF ₃ ,4-NO ₂ 7t	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	9,77	± 0,29	9,87	± 0,29	9,82	± 0,34
	24	7,75	± 0,18	9,26	± 0,41	12,45	± 0,48
	48	6,80	± 0,17	8,67	± 0,33	14,90	± 0,90
	72	7,10	± 0,27	7,06	± 0,34	18,10	± 1,10
	96	7,46	± 0,65	6,32	± 0,18	22,33	± 2,04

Tabela 6.24 – Número de parasitas/mL após exposição ao composto de referência benznidazol, BZN.

benznidazol <i>bzn</i>	Tempo (horas)	parasitas * 10 ⁶ / mL					
		50 µg/mL		20 µg/mL		10 µg/mL	
	0	9,84	± 1,62	10,33	± 0,74	10,63	± 0,67
	24	10,49	± 0,82	11,83	± 0,77	14,03	± 1,89
	48	10,20	± 0,89	12,59	± 0,93	18,21	± 1,61
	72	9,08	± 1,18	13,47	± 1,15	22,03	± 2,20
	96	8,65	± 1,05	13,82	± 1,22	25,31	± 3,16

Para demonstrar um comparativo da atividade anti-*T.cruzi* entre os compostos **7a** – **7t**, assim como com o fármaco de referência e o efeito de todos sobre o crescimento normal parasitário na ausência de qualquer composto (CP), as figuras 6.13 – 6.15 foram elaboradas a fim de ilustrar tais efeitos.

Os compostos que apresentaram melhor atividade quando testados na concentração de 10 µg/mL, figura 6.13, foram 4-CF₃ (**7n**), 3-CF₃,4-NO₂ (**7t**), 4-I (**7q**), 4-Cl (**7i**), 4-H (**7a**), 3,4-Cl₂ (**7s**) e 4-CH₃ (**7b**). Estes compostos apresentaram atividade superior quando comparados ao benznidazol (bzn).

Aplicando a equação 5.4 para determinar a %IC, observa-se que o composto **7n** inibiu em média, 86% do crescimento parasitário.

Os compostos 4-OH (**7d**), 4-SO₂NH₂ (**7p**) apresentaram as menores atividades, sendo que no caso do composto **7d**, após 48 horas, não se observa mais nenhum tipo de inibição de crescimento parasitário.

Nestas concentrações, nenhum composto atuou eliminando as formas epimastigotas inoculadas no dia 0.

Figura 6.12 – Concentração de parasitas durante as 96 horas após a adição de 10 μ g/mL dos compostos **7a** – **7t**, e benznidazol **bzn**. A linha vermelha indica a concentração de parasitas em 0 horas. CP = controle positivo.

A partir do uso de concentrações ≥ 20 $\mu\text{g/mL}$, foi possível observar que os compostos com grupos substituintes com caráter hidrofóbicos e retiradores de elétrons, tais como 4-F (**7e**), 4-Cl (**7i**), 4-CF₃ (**7n**), 4-Br (**7o**), 4-I (**7q**), 3,4-Cl₂ (**7s**) e 3-CF₃,4-NO₂ (**7t**), atuaram eliminando as formas epimastigotas inoculadas no dia 0. O mesmo perfil de atividade também foi observado para o composto 4-H (**7a**). A comparação dos dados obtidos utilizando 20 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$ estão ilustrados nas figuras 6.13 e 6.14 respectivamente.

O composto **7n** demonstrou a melhor atividade na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, sendo que apresentou índices de redução da concentração parasitária inicial em torno de 30%. Nestas concentrações, o benznidazol atua apenas inibindo o crescimento parasitário e novamente verifica-se que os compostos 4-OH (**7d**) e 4-SO₂NH₂ (**7p**) apresentaram as menores atividades.

Quando os compostos foram ensaiados utilizando 50 $\mu\text{g/mL}$, o composto 4-CF₃ (**7n**) demonstrou novamente uma atividade interessante, uma vez que em 24 horas reduziu a concentração inicial de formas epimastigotas em 54%. Entretanto a melhor atividade observada foi a do composto 4-H (**7a**), o qual após 96 horas de incubação eliminou 85% das formas parasitárias iniciais.

Em 24 horas, além dos compostos **7a** e **7n**, os derivados monosubstituídos 4-F (**7e**) e 4-CH₂CH₃ (**7g**), e dissustituídos 2,4-Cl₂ (**7r**), 3,4-Cl₂ (**7s**) e 3-CF₃,4-NO₂ (**7t**), demonstraram melhor atividade do que o benznidazol, uma vez que atuaram eliminando as formas epimastigotas inoculadas no dia 0. O mesmo efeito para o fármaco de referência só foi observado a partir de 72 horas.

Figura 6.13 – Concentração de parasitas durante as 96 horas após a adição de 20 μ g/mL dos compostos **7a** – **7t**, e benznidazol **bzn**. A linha vermelha indica a concentração de parasitas em 0 horas. CP = controle positivo.

Figura 6.14 – Concentração de parasitas durante as 96 horas após a adição de 50 μ g/mL dos compostos **7a** – **7t**, e benznidazol **bzn**. A linha vermelha indica a concentração de parasitas em 0 horas. CP = controle positivo.

6.4.3 Ensaios na fase estacionária

A fim de avaliar quantitativamente a influência dos grupos substituintes na atividade anti-*T. cruzi* dos compostos, foram realizados ensaios na fase estacionária de crescimento parasitário, a fim de obter as concentrações que inibem o crescimento de 50% das formas epimastigotas (%IC₅₀), a partir de uma concentração inicial de $2,0 \times 10^6$ parasitas/mL [50, 51]. Os compostos foram testados em triplicatas, em concentrações que variaram entre 5 – 120 µg/mL.

O ajuste das curvas de dose-resposta, assim como os valores de %IC₅₀ e do coeficiente de determinação r^2 foram obtidos utilizando o modelo sigmoidal realizados no software OriginPro 8.0⁵. Os resultados obtidos, calculados e ilustrados dos compostos **7a** – **7t** encontram-se nas tabelas 6.25 – 6.44, e o resultados referentes ao benznidazol estão descritos na tabela 6.45.

Tabela 6.25 – Curva de dose-resposta do composto *N'-(benzofuroxan-5-il)metileno benzidrazida (7a)*.

a: Desvio padrão

⁵ OriginPro 8.0 SR0 v8.0; OriginLab Corporation: 2007. 01060 One Roundhouse Plaza, Northhampton, MA, USA.

Tabela 6.26 – Curva de dose-resposta do composto
4-metil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7b**).

a: Valor retirado da análise.

Tabela 6.27 – Curva de dose-resposta do composto
4-amino[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7c**).

a: Valor retirado da análise.

Tabela 6.28 – Resultados de %IC obtidos após a exposição ao composto *4-hidróxi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7d)*.

	concentração	IC	DP
	μM	%	
4-OH 7d	80	0	NÃO HOUVE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO PARASITÁRIO
	50	0	
	25	0	
	5	0	

Tabela 6.29 – Curva de dose-resposta do composto *4-fluoro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7e)*.

	concentração	IC	DP
	μM	%	
4-F 7e	50	100	1,9
	25	87	3,0
	20	77	2,4
	15	51	3,5
	10	19	3,4
	5	10	1,6

Tabela 6.30 – Curva de dose-resposta do composto *4-ciano[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(7f)*.

	concentração	IC	DP
	μM	%	
4-CN 7f	60	100	1,0
	50	99	0,5
	30	92	0,7
	25	29	3,4
	5	6	5,2

Tabela 6.31 – Curva de dose-resposta do composto
4-etil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7g**).

a: Valor retirado da análise.

Tabela 6.32 – Curva de dose-resposta do composto
4-metóxi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7h**).

Tabela 6.33 – Curva de dose-resposta do composto
4-cloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7i**).

Tabela 6.34 – Curva de dose-resposta do composto
4-acetil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7j**).

Tabela 6.35 – Resultados de %IC obtidos após a exposição ao composto
4-dimetilamino[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7k**).

Tabela 6.36 – Curva de dose-resposta do composto
4-etóxi[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida (**7l**).

Tabela 6.37 – Curva de dose-resposta do composto
4-nitro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7m**).

Tabela 6.38 – Curva de dose-resposta do composto
4-trifluoro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7n**).

a: Valor retirado da análise.

Tabela 6.39 – Curva de dose-resposta do composto
4-bromo[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7o**).

Tabela 6.40 – Curva de dose-resposta do composto
4-sulfamoil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7p**).

Tabela 6.41 – Curva de dose-resposta do composto
4-iodo[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7q**).

Tabela 6.42 – Curva de dose-resposta do composto
2,4-dicloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7r**).

Tabela 6.43 – Curva de dose-resposta do composto
3,4-dicloro[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7s**).

Tabela 6.44 – Curva de dose-resposta do composto
4-nitro-3-(trifluorometil)-[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida(**7t**).

Tabela 6.45 – Curva de dose-resposta do benznidazol.

A curva de dose-resposta foi determinada para todos os compostos com no mínimo cinco pontos. Para os compostos 4-CH₃ (**7b**), 4-NH₂ (**7c**), 4-CH₂CH₃ (**7g**) e 4-CF₃ (**7n**), optou-se em retirar um valor da análise em função de melhorar o valor de r^2 e reduzir o valor do desvio padrão do valor de % IC₅₀. O valor excluído corresponde aos dados que apresentaram valores residuais altos na análise.

O cálculo da curva de dose-resposta dos compostos 4-I (**7q**) e 3,4-Cl₂ (**7s**) foi realizado utilizando o log da concentração. Esse ajuste foi necessário para que o modelo pudesse calcular o valor de %IC₅₀ desses compostos. Para os compostos 4-NH₂ (**7b**) e 4-SO₂NH₂ (**7p**) o cálculo de %IC₅₀ foi realizado utilizando modelo exponencial, uma vez que não foi encontrado valores de %IC maiores que 80%, e desta forma, o modelo dose-resposta não pode ser aplicado. Entretanto, apesar dessa mudança, os valores de % IC₅₀ encontram-se perto da faixa do valor de % IC₅₀ experimental.

Os resultados de % IC₅₀ dos compostos estão demonstrados na tabela 6.46. Os dois compostos mais ativos foram os derivados substituídos 4-I (**7q**) e 4-Br (**7o**) com valores de %IC₅₀ de 6,11 μM (aproximadamente 2,50 $\mu g/mL$) e 7,38 μM (2,80 $\mu g/mL$), respectivamente. Por outro lado, as menores atividades foram observadas para os derivados substituídos 4-NH₂ (**7b**) e 4-SO₂NH₂ (**7p**), os quais apresentaram os respectivos valores de % IC₅₀ de 116,96 μM (34,74 $\mu g/mL$) e 60,38 μM (21,80 $\mu g/mL$). Os compostos

4-OH (**7d**) e 4-N(CH₃)₂ (**7k**) não apresentaram atividade anti-*T. cruzi* nas concentrações testadas.

Tabela 6.46 – % IC₅₀ dos compostos **7a** – **7t** e benznidazol.

	R ₁	R ₂	R ₃	% IC ₅₀			R ₁	R ₂	R ₃	% IC ₅₀	
				μM	μg/mL					μM	μg/mL
7a	H	H	H	16,92	4,77	7k	N(CH ₃) ₂ ^a	H	H	-	-
7b	CH ₃	H	H	11,86	3,51	7l	OCH ₂ CH ₃	H	H	9,62	3,14
7c	NH ₂	H	H	116,96	34,75	7m	NO ₂	H	H	17,84	5,83
7d	OH ^a	H	H	-	-	7n	CF ₃	H	H	9,62	3,37
7e	F	H	H	15,29	4,59	7o	Br	H	H	7,78	2,80
7f	CN	H	H	26,58	8,16	7p	SO ₂ NH ₂	H	H	60,38	21,80
7g	CH ₂ CH ₃	H	H	9,91	3,07	7q	I	H	H	6,11	2,49
7h	OCH ₃	H	H	13,2	4,12	7r	Cl	H	Cl	9,54	3,34
7i	Cl	H	H	9,96	3,15	7s	Cl	Cl	H	9,07	3,17
7j	COCH ₃	H	H	16,01	5,19	7t	NO ₂	CF ₃	H	15,93	6,29
benznidazol				20,84	5,42						

^a não apresentou atividade nas condições de solubilidade permitida pelo ensaio.

A influência das propriedades físico-químicas dos grupos substituintes na atividade biológica foi observada. Em geral, a presença de grupos hidrofóbicos e retiradores de elétrons ligados a posição 4 do anel benzênico resultam em compostos mais ativos do que o fármaco de referência (%IC₅₀ = 20,84 μM; 5,42 μg/mL). Os três compostos dissustituídos (**7r**, **7s**, **7t**) também demonstraram serem mais ativos do que o benznidazol.

Grupos substituintes hidrofóbicos, tais como 4-CH₃ (**7b**) and 4-OCH₃ (**7h**) ligados ao anel benzenênico favoreceram a atividade anti-*T. cruzi*. Entretanto grupos substituintes hidrofílicos, tais como 4-NH₂ (**7c**), 4-CN (**7f**) e 4-SO₂NH₂ (**7p**) contribuíram de maneira

desfavorável para a atividade. O aumento da cadeia alquílica nos compostos 4-CH₂CH₃ (**7g**) e 4-OCH₂CH₃ (**7l**) favoreceu a bioatividade *in vitro*.

O efeito eletrônico também demonstrou influenciar na atividade anti-*T. cruzi*, como pode ser observado para os compostos que apresentam grupos retiradores de elétrons (4-Cl (**7i**), 4-Br (**7o**), e 4-I (**7q**)).

6.5 Conclusões

Todos os vinte compostos sintetizados foram testados frente a formas epimastigotas de cepas Y de *T. cruzi*, sendo realizados ensaios nas fases logarítmica e estacionária do crescimento parasitário. Os resultados da fase log identificaram compostos interessantes e mais ativos do que o benznidazol, fármaco utilizado na terapêutica atual da Doença de Chagas e usado como referência nos ensaios. Destaque para o composto 4-trifluorometil[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida que inibiu o crescimento de parasitas em torno de 86% com apenas 10 µg/mL. Os ensaios na fase estacionária também revelaram compostos promitentes. Do total de compostos ensaiados, dezoito demonstraram atividade inibitória frente ao *T. cruzi*, dos quais quatorze mostraram um valor de % IC₅₀ menor do que o benznidazol. Nestes ensaios, o composto 4-iodo[N'-(benzofuroxan-5-il)metileno]benzidrazida se mostrou mais ativo, com valor de %IC₅₀ em torno de 2,50 µg/mL, o que equivale aproximadamente a metade da concentração obtida para o mesmo efeito do benznidazol.

Estes resultados, aliados com os resultados obtidos nos ensaios frente a cepas *Staphylococcus aureus*, reforçam o potencial desta série de compostos na busca por um possível composto líder, direcionando desta forma, o desenvolvimento de um novo candidato a fármaco eficaz contra estes patógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] TRND – Therapeutics for Rare and Neglected Diseases. Disponível em: <<https://rarediseases.info.nih.gov/TRND/>>. Acesso em: 16 Jul 2010.
- [2] DNDi – Drugs for Neglected Diseases initiative. Disponível em: <<http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas.html>>. Acesso em: 16 Jul 2010.
- [3] MURRAY, C.L. Quantifying the burden of disease: the technical basis for disability-adjusted life years. *Bull World Health Organ.* 72, 429 – 445, **1994**.
- [4] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2006) About the Global Burden of Disease Project. Disponível em: <<http://www.who.int/healthinfo/bodabout/en/index.html>>. Acesso em: 16 Jul 2010.
- [5] DIAS, L.C., DESOY, M.A., THIEMANN, O.H., OLIVA, G., ANDRICOPULO, A.D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim Nova.* 32, 2444 – 2457, **2009**.
- [6] MORAN, M. (2009) G-FINDER. Neglected Disease Research & Development: New Times, New Trends. Health Policy Division, The George Institute for International Health. Disponível em: <<http://www.thegeorgeinstitute.org/>>. Acesso em : 16 Jul 2010.
- [7] CHAGAS, C.R.J. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1, 159 – 218, **1909**.
- [8] RASSI JR, A., RASSI A., MARIN-NETO, J.M. Chagas disease. *Lancet.* 375, 1388 – 1402, **2010**.
- [9] COURA, J.R., VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature.* 465, S6 – S7, **2010**.
- [10] MONCAYO, A., SILVEIRA, A.C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 (Suppl. I), 17 – 30, **2009**.

- [11] COURA, J.R., DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104 (Suppl. I), 31 – 40, **2009**.
- [12] LANNES-VIEIRA, J., ARAÚJO-JORGE, T.C., SOEIRO, M.N.C., GADELHA, P., CORRÊA-OLIVEIRA, R. The Centennial of the Discovery of Chagas Disease: Facing the Current Challenges. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e645, **2010**.
- [13] GONTIJO, E.D. Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas. Portal Doença de Chagas da Fiocruz (**2007**). Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acesso em: 18 Jul 2010.
- [14] PEREZ-GUTIERREZ, E., AGRELO, R.S., FIGUEROA, R. Consulta técnica em epidemiologia, prevenção e manejo da transmissão da doença de Chagas como doença transmitida por alimentos. *Rev Soc Bras Med Trop.* 39, 512-514, **2006**.
- [15] PEREIRA, K.S., SCHMIDT, F.L., GUARALDO, A.M., FRANCO, R.M., DIAS, V.L., PASSOS, L.A. Chagas disease as a foodborne illness. *J Food Prot.* 72, 441–446, **2009**.
- [16] SCHMUNIS, G.A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 102 (Suppl. I): 75–85, **2007**.
- [17] CARVALHO, T.C. Estudo por microscopia óptica. Portal Doença de Chagas da Fiocruz (**2007**). Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acesso em: 18 Jul 2010.
- [18] ALMEIDA-DE-FARIA, M., FREYMÜLLER, E., COLLI, W., M. J. M. ALVES, M.J.M. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an Intracellular Epimastigote-like Form. *Exp. Parasitol.* 92, 263 – 274, **1999**.
- [19] CARVALHO, T.C. Cultura de células. Portal Doença de Chagas da Fiocruz (**2007**). Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acesso em: 18 Jul 2010.
- [20] ANDRADE, Z.A. A Patologia da doença de Chagas. Portal Doença de Chagas da Fiocruz (**2007**). Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acesso em: 18 Jul 2010.
- [21] FEASEY, N., WANSBROUGH-JONES, M., MABEY, D.C.W., SOLOMON, A.W. Neglected tropical diseases. *Br Med Bul.* 93, 179 – 200, **2010**.

- [22] DEVERA, R., ILLARRAMENDI, X., MONTTOYA-ARAÚJO, R., PIRMEZ, C., FERNANDES, O., COURA, J.R. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop.* 35, 323-330, **2002**.
- [23] ANDRADE, Z.A. Patologia. In: Brener Z., Andrade Z.A. Eds. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, **1979**. p.214 – 218.
- [24] ANDRADE, S.G. Patologia experimental da doença de Chagas: modelos em camundongos. Portal Doença de Chagas da Fiocruz (**2007**). Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acesso em: 19 Nov 2010.
- [25] ANDRADE, S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Rev Soc Bras Med Trop.* 18, 39-46, **1985**.
- [26] 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.* 30, 27-35, **1997**.
- [27] MAYA, J.D., CASSELS, B.K., ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P., FERREIRA, J., FAÚNDEZ, M., GALANTI, N., FERREIRA, A., MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host, *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol.* 146, 601–620, **2007**.
- [28] DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs, *Chem Biol Interact.* 73, 1–27, 1990.
- [29] CASTRO, S.L., SOEIRO, M.N. A pesquisa de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas. Portal Doença de Chagas da Fiocruz (**2007**). Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/chagas>>. Acesso em: 24 Jul 2010.
- [30] COURA, J.R., CASTRO, S.L. A Critical Review on Chagas disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97, 3-24, **2002**.
- [31] PONTES, V.M.O., SOUZA JUNIOR, A.S., CRUZ, F.M.T., COELHO, H.L.L., DIAS, A.T.N., COELHO, I.C.B., OLIVEIRA, M.F. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop.* 43, 182-187, **2010**.

- [32] CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M. Synthetic Medicinal Chemistry in Chagas' Disease: Compounds at The Final Stage of "Hit-To-Lead" Phase. *Pharmaceuticals*. 3, 810-838, **2010**.
- [33] CASTRO, J.A., MECCA, M.M., BARTEL, L.C. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis) *Hum Exp Toxicol Human*. 25, 471-479, **2006**.
- [34] STEVERDING, D., TYLER, K.M. Novel antitrypanosomal agents. *Exp Opin Invest Drugs*. 14, 939-955, **2005**.
- [35] SILVA, L.H.P., NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol*. 20, 191 – 207, **1953**.
- [36] POZAS, R., CARBALLO, J., CASTRO, C., RUBIO, J. Synthesis and *in vitro* antitrypanosomal activity of novel nifurtimox analogues. *Bioorg Med Chem Lett*. 15, 1417–1421, **2005**.
- [37] 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*. 42, 1941-1950, **1999**.
- [38] AGUIRRE, G., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZALEZ, M., PORCAL, W., SEOANE, G., ORTEGA, M.A., ALDANA, I., MONGE, A., DENICOLA, A. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Structure-activity relationships. Part II. *Arch Pharm*. 335, 15–2, **2002**.
- [39] 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*. 337, 259–270, **2004**.
- [40] AGUIRRE, G., BOIANI, L., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZALEZ, M., PORCAL, W., DENICOLA, A., MOLLER, M., THOMSON, L., TORTORA, V. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part 3: Substituents-clustering methodology in the search for new active compounds. *Bioorg Med Chem*. 13, 6324–6335, **2005**.

- [41] AGUIRRE, G., BOIANI, L., BOIANI, M., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., PORCAL, W., DENICOLA, A., PIRO, O.E., CASTELLANO, E.E., SANT'ANNA, C.M.R., BARREIRO, E.J. New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth: Quantitative structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem.* 13, 6336-6346, **2005**.
- [42] 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.* 13, 3197-3207, **2005**.
- [43] BOIANI, L., GERPE, A., ARÁN, V.J., TORRES DE ORTIZ, S., SERNA, E., VERA DE BILBAO, N., SANABRIA, L., YALUFF, G., NAKAYAMA, H., ROJAS DE ARIAS, A., MAYA, J.D., MORELLO, J.A., CERECETTO, H., GONZÁ LEZ, M. *In vitro* and *In vivo* Antitrypanosomatid Activity of 5-Nitroindazoles. *Eur J Med Chem.* 44, 1034-1040, **2008**.
- [44] BOIANI, M., BOIANI, L., MERLINO, A., HERNÁNDEZ, P., CHIDICHIMO, A., CAZZULO, J.J., CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M. Second generation of 2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives as anti-trypanosomatid agents: synthesis, biological evaluation, and mode of action studies. *Eur J Med Chem.* 44, 4426-4433, **2009**.
- [45] 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.* 45, 2154-2164. **2010**.
- [46] 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.* 1, 216-228, **2010**.
- [47] TYLER, K.M., ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited, *Int J Parasitol.* 31, 472-481, **2001**.
- [48] FAUCHER, J.F., BALTZ, T., PETRY, K.G. Detection of an epimastigote-like intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 81, 441-443, **1995**.

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

[50]SCHVARTZAPEL, A.J., ZHONG, L., DOCAMPO, R., RODRIGUEZ, J.B., GROS, E.G. J Med Chem, 40(15), 2314-2322, 1997.

[51]ELHALEM, E., BAILEY, B.N., DOCAMPO, R., UJVÁRY, I., SZAJNMAN, S.H., RODRIGUEZ, J.B. Design, synthesis, and biological evaluation of new growth inhibitors of Trypanosoma cruzi (epimastigotes). J Med Chem. 45, 3984-3999, **2002**.

Estudos de QSAR

(Quantitative Structure-Activity Relationships)

7.1 Introdução

As relações quantitativas entre estrutura química e a atividade biológica (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationships*) de substâncias bioativas são baseadas na suposição de que uma determinada molécula possui propriedades de natureza hidrofóbica (ou lipofílica), eletrônica, estereoquímica, etc., derivadas da estrutura química e que são responsáveis pela resposta biológica. As propriedades moleculares correspondem, então, aos descritores ou variáveis independentes e são relacionadas ao dado biológico (variável dependente) com o objetivo de obter um modelo matemático confiável [1].

Várias abordagens de QSAR foram desenvolvidas ao longo das últimas décadas, desde os modelos uni e bidimensionais propostos por Hansch-Fujita e por Free-Wilson até a abordagem em seis dimensões proposta por Vedani e, independente da dimensionalidade, estes modelos demonstram ser ferramenta valiosa para previsão e concepção de substâncias bioativas [2]. Além disso, os diferentes tipos de estudos de QSAR compartilham dos mesmos objetivos, a saber [2]:

- correlacionar quantitativamente e resumir as relações entre modificações moleculares nas estruturas químicas e as respectivas alterações nos “*endpoints*” biológicos para a compreensão de quais propriedades são realmente determinantes para o efeito biológico desejado;
- otimizar compostos-protótipos já existentes, de modo a melhorar a sua atividade biológica;
- prever a atividade biológica de compostos ainda não testados ou não disponíveis.

7.2 Análise de Hansch – QSAR-2D

Os primeiros estudos de QSAR centraram-se principalmente na análise do efeito na atividade biológica de séries congêneres, relacionada a diferenças em grupos substituintes em anéis aromáticos, as quais são representadas por descritores estruturais que codificam as características hidrofóbicas, eletrônicas e estereoquímicas de substituintes [3].

Em 1964, Hansch e Fujita [4], propuseram o primeiro **modelo linear**, no qual tais descritores foram combinados, para definir quantitativamente as relações entre atividade biológica e os descritores estruturais, equação 7.1. A abordagem de Hansch-Fujita é também chamada de relação linear de energia livre (LFER, *Linear Free Energy Relationships*) ou abordagem extra-termodinâmica, já que a maioria dos descritores são derivados de constantes de equilíbrio, portanto, relacionados com a termodinâmica de reação [5].

$$\log 1/C = k_1 \log P + k_2 \sigma + \text{termo independente} \quad (\text{Eq. 7.1})$$

Em que:

$\log 1/C$ = logaritmo da atividade biológica do composto;

C = concentração do composto em mol/L;

$\log P$, σ = descritores estruturais que expressam as interações envolvidas no sistema investigado (hidrofóbicas e eletrônicas, respectivamente);

k_1 e k_2 = coeficientes de regressão que expressam as contribuições relativas de cada parâmetro utilizado na resposta biológica (variável dependente).

Devido à relação não linear observada em casos com grande variação de lipofilicidade entre os compostos de séries análogas [6], Hansch propôs o **modelo parabólico**, com a introdução do termo quadrático no descritor hidrofóbico [7], equação 7.2, para explicar que a atividade biológica é favorecida com o aumento de hidrofobicidade até um máximo, e logo após, com o aumento da hidrofobicidade, a atividade tende a decair [8].

$$\log 1/C = -k_1 (\log P)^2 + k_2 \log P + k_3 \sigma + \text{termo independente} \quad (\text{Eq. 7.2})$$

Em que:

$\log 1/C$ = logaritmo da atividade biológica do composto;

C = concentração do composto em mol/L;

$\log P$, σ = descritores estruturais que expressam as interações envolvidas no sistema investigado (hidrofóbicas e eletrônicas, respectivamente);

k_1 , k_2 e k_3 = coeficientes que expressam as contribuições relativas de cada parâmetro utilizado na resposta biológica (variável dependente).

Kubinyi [9] descreveu a dependência não linear da atividade biológica em função da hidrofobicidade através do **modelo bilinear** representado na equação 7.3. Este modelo representou grande avanço em relação ao modelo parabólico proposto anteriormente, já que a curva proveniente desta relação é resultante da conjunção dos dois modelos anteriores e descreve melhor o comportamento do fármaco no sistema biológico [5, 6, 8].

$$\log 1/C = k_1 \log P - k_2 \log(\beta P + 1) + \text{termo independente} \quad (\text{Eq. 7.3})$$

Em que:

$\log 1/C$ = logaritmo da atividade biológica do composto;

C = concentração do composto em mol/L;

$\log P$ = parâmetro ou descritor hidrofóbico;

k_1 , k_2 e β = coeficientes que expressam as contribuições relativas de cada parâmetro utilizado na resposta biológica (variável dependente).

Os coeficientes k_1 e k_2 e o termo independente são termos lineares, enquanto que o coeficiente β é o termo não linear, obtido por procedimentos iterativos [5]. Desta forma, os segmentos ascendentes e descendentes do modelo assumem características lineares, enquanto que em seu máximo o perfil da curva se aproxima ao modelo parabólico [8]. A figura 7.1 ilustra os perfis dos modelos linear, parabólico e bilinear relacionando a atividade biológica (AB) com as propriedades físico-químicas (PFQ) ou descritores.

Figura 7.1 – Perfil dos modelos linear, parabólico e bilinear [8].

7.2.1 Descritores utilizados na análise de Hansch

As propriedades físico-químicas comumente estudadas na análise de Hansch são expressas por descritores, que incluem informações para explicar as propriedades eletrônicas, os efeitos estereoquímicos e a hidrofobicidade, determinados empiricamente, ou, mais recentemente, por métodos computacionais.

Os **parâmetros eletrônicos** descrevem a influência de grupos substituintes na distribuição da densidade eletrônica do sistema molecular investigado [5]. Tais propriedades eletrônicas podem ser descritas por parâmetros como a constante σ **de Hammett**, os parâmetros de campo $\mathcal{J}$ e de ressonância $\mathcal{R}$, de Swain e Lupton, e os valores de constantes de ionização, K_a . Adicionalmente, parâmetros experimentais obtidos por técnicas espectroscópicas, tais como, frequência de absorção na região do infravermelho, ν [10], valores do deslocamento químico em espectros de RMN, δ [5], podem, também, ser utilizados nos estudos de QSAR. Descritores calculados por métodos de mecânica quântica, tais como energias de orbitais de fronteira E_{HOMO} (*Highest Occupied Molecular Orbital Energy*) e E_{LUMO} (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital Energy*), momento de dipolo, μ , entre outros, são considerados para expressar a propriedade eletrônica de um sistema molecular.

Os **parâmetros estereoquímicos** descrevem as possíveis interferências causadas pela variação no tamanho de um grupo substituinte na molécula, por exemplo, a afinidade com que o composto irá se encaixar no receptor, bem como, a natureza e posição relativa adequada dos grupos funcionais em relação ao sítio de interação do receptor, diretamente responsáveis pelo tipo e pela força da interação com os resíduos de aminoácido (complementaridade) [5, 8, 11]. Tais propriedades podem ser descritas pelos parâmetros de **STERIMOL**, desenvolvidos por Verloop [12], volume de van der Waals, V_w , dentre outros.

Os **parâmetros de polarizabilidade** descrevem as interações fármaco-receptor (FR) que ocorrem por forças de dispersão de London, dentre os quais está a refratividade molar, **MR**, que é um descritor muito utilizado em QSAR. A MR é uma propriedade físico-química constitutiva e aditiva, portanto, dependente da estrutura da molécula [8]. A escolha deste parâmetro em modelos de QSAR, deve ser realizada de maneira criteriosa, uma vez

que a MR pode ser relacionada com parâmetros estereoquímicos. A equação de Lorentz-Lorenz, equação 7.4, usada para obter os valores de MR experimentalmente comprova tal correlação [5, 8, 13]:

$$MR = \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \left(\frac{MM}{d} \right) \quad (\text{Eq. 7.4})$$

Em que: MR = refratividade molar; n = índice de refratividade; MM = massa molecular e d = densidade do composto.

Uma vez que o índice de refração dos compostos não varia de maneira significativa, e assumindo que $MM/d = V_m$, é possível comprovar tal correlação. Adicionalmente, os valores de MR também podem ser dependentes do parâmetro de hidrofobicidade π , já que ambos dependem do volume molar [5, 8, 13].

Os **parâmetros de hidrofobicidade** descrevem as interações hidrofóbicas nas ligações FR e as propriedades farmacocinéticas (ADME) de um composto, e podem ser descritos pelo parâmetro **π de Hansch-Fujita**, ou mais frequentemente, pelo coeficiente de partição, **logP** [5, 11]. O logP reflete quantitativamente as propriedades lipofílicas de uma molécula, as quais refletem a afinidade de um determinado composto por uma fase orgânica (apolar) em relação a fase aquosa (polar) [14]. O composto demonstrará uma maior afinidade pela fase orgânica (lipofilicidade) quando suas interações hidrofóbicas com a fase aquosa forem intensas. Quando as interações polares com a fase aquosa forem as mais intensas, o composto demonstrará maior afinidade pela água (hidrofilicidade) [14]. Assim, a lipofilicidade pode ser expressa como resultado da somatória das interações hidrofóbicas menos a somatória das interações polares entre o composto e o sistema bifásico, equação 7.5 [14]:

$$\text{Lipofilicidade} = \text{Interações Hidrofóbicas} - \text{Interações Polares} \quad (\text{Eq. 7.5})$$

Quanto aos aspectos de ADME, os fármacos frequentemente devem atravessar as membranas celulares para alcançarem o seu receptor [5, 6, 8, 11, 15]. Estas membranas são formadas por dupla camada lipídica com extremidades hidrofóbicas voltadas para o

interior e as hidrofílicas voltadas para o exterior, sendo portanto, permeável à água e soluções lipossolúveis, porém impermeáveis a íons e a moléculas polares não carregadas [15]. Uma vez que os fármacos, em sua maioria consistem em ácidos ou bases fracas, estes se encontram presentes e em equilíbrio em solução sob as formas não-ionizada e ionizada. De maneira geral, as moléculas não-ionizadas são mais lipossolúveis e podem difundir-se através da membrana celular por processo passivo, na dependência do gradiente de concentração do sistema e do coeficiente de partição da molécula [8, 16]. Por outro lado, as moléculas ionizadas geralmente não conseguem penetrar na membrana biológica por causa de sua baixa lipossolubilidade e por, normalmente, se encontrarem solvatadas por moléculas de água, dificultando o processo de absorção passiva [16]. Desta maneira, a absorção da forma ionizada, quando existente, ocorre por processo ativo e tem sua distribuição condicionada a constante de ionização da molécula e ao pH do meio [8, 16].

O valor do coeficiente de partição pode ser obtido **empiricamente**, pelo método “shake-flask”, cromatografia em camada delgada, CCD, e cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE [5, 8], ou por **métodos teóricos**, tais como, pelos métodos de aditividade de fragmentos, método de Ghosen-Crippen ou método de Villar [17,18], dentre outros.

7.2.2 Modelo matemático utilizado na análise de Hansch

A regressão linear múltipla (MLR, *Multiple Linear Regression*) é o modelo matemático mais utilizado na análise de Hansch [6], e tem o objetivo de estabelecer correlações entre as variáveis independentes (parâmetros ou descritores, $X_1, X_2, \dots, X_k$) e a variável dependente (atividade biológica, Y), de acordo com a equação 7.6, onde $a_0, a_1, a_2, \dots, a_k$ representam os coeficientes da regressão ou de ajuste [19].

$$Y = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2 + \dots + a_k X_k \quad (\text{Eq. 7.6})$$

Estudos de QSAR que usam MLR como ferramenta matemática são considerados como tradicionais ou métodos de QSAR clássico [3].

A equação geralmente contém número relativamente pequeno de descritores, de modo a tornar o modelo de fácil interpretação [3], mas a obtenção de modelos robustos de QSAR clássico é determinada tanto pela escolha correta da série de compostos que define o estudo, como pela validade estatística da correlação e da capacidade de previsão do modelo obtido [3, 8]. Dessa forma, Unger e Hansch em 1973 [20], propuseram regras básicas para a construção e validação dos modelos matemáticos utilizados para esta finalidade [21]:

1ª) Seleção de variáveis independentes: deve-se considerar descritores de natureza distinta, incluindo propriedades hidrofóbicas, eletrônicas, estereoquímicas e de polarizabilidade, assim como variáveis independentes geradas a partir de cálculos de mecânica quântica e variáveis indicadoras [5, 21]. As variáveis selecionadas na melhor equação devem ser independentes entre si (o valor do coeficiente de intercorrelação, r , deve ser $< 0,6 - 0,7$); exceções são as combinações de termos lineares e quadráticos, como $\log P$ e $(\log P)^2$, que são altamente correlacionados, com valores de $r > 0,9$ [5].

2ª) Validação estatística das variáveis selecionadas: a validação do modelo de QSAR é parte essencial no desenvolvimento de modelos, pois a real utilidade de um modelo de QSAR está na sua capacidade de prever, de forma mais confiável possível, o dado experimental modelado para novos compostos [22]. A qualidade de um modelo de QSAR é avaliada através da análise dos seguintes parâmetros:

- **coeficiente de correlação, r :** valor de 1,0 indica correlação perfeita. São considerados bons modelos aqueles que apresentam $r > 0,8$ [5];

- **fração da variância:** expressa pelo coeficiente de determinação múltipla R^2 , o qual pode variar entre 0 e 1, onde 1 significa um modelo perfeito e que explica 100% da variância nos dados. Sugere-se que apenas modelos com valores de $R^2 > 0,6$ sejam considerados para a validação [22];

- **coeficiente de validação cruzada *leave-one-out*, Q^2 :** modelos com boa capacidade preditiva devem apresentar valores de $Q^2 > 0,5$. Além disso, a diferença entre os valores de R^2 e Q^2 não devem exceder 0,3 [22].;

- **desvio padrão, s :** os melhores modelos de QSAR apresentam pequenos valores de desvio [22];

- **teste de Fischer, F:** o valor de F é uma medida para a significância estatística do modelo. Valores altos de F indicam significância no nível de 95% de confiança [5].

3ª) Princípio da Parcimônia: quando vários modelos mostram-se aproximadamente equivalentes, o mais simples deve ser selecionado [21].

4ª) Número de variáveis no modelo: para minimizar a ocorrência de correlação ao acaso ou chance de correlação, a proporção de compostos para cada variável utilizada deve ser no máximo de 5 para 1 [21];

5ª) Modelo Qualitativo: é essencial que o modelo obtido seja consistente com os processos físico-químicos e biológicos envolvidos [5].

A análise de Hansch mostra-se, do ponto de vista operacional, mais simples e mais rápida quando comparada com os métodos 3D e multidimensionais, entretanto, apesar de ser utilizada desde a década de 60 no estabelecimento de correlações e previsões da atividade de compostos, apresenta algumas limitações em determinadas situações, como por exemplo: *i)* apenas estruturas 2D são consideradas; *ii)* indisponibilidade de descritores tabelados para substituintes não comuns; *iii)* restrito a apenas algumas substituições em comum na estrutura de referência, por exemplo, variação de grupos substituintes em anéis aromáticos; *iv)* não proporciona soluções únicas; *v)* falta de representação da estereoquímica ou estrutura 3D da molécula; *vi)* a falta de visualização gráfica dificulta a interpretação dos resultados [2].

7.3 Abordagem VolSurf – QSAR-3D

A metodologia de QSAR-3D abrange os métodos que correlacionam a atividade biológica com as propriedades tridimensionais (3D) do sistema molecular investigado, considerando a influência da conformação e estereoquímica na resposta biológica [2, 23]. Assim, várias etapas para obter os descritores que codificam as informações pertinentes às características estruturais e espaciais dos compostos são envolvidas nesta metodologia[24].

Em primeiro lugar, a conformação da molécula deve ser determinada com auxílio de dados experimentais, obtidos a partir de estruturas cristalográficas de referência disponíveis em banco de dados ou a partir de estudos RMN em solução [25]. Caso a estrutura não esteja disponível, por aplicação de métodos de mecânica clássica e de mecânica quântica na otimização de geometria do sistema molecular [25]. Em seguida, os confôrmeros do conjunto de dados devem ser alinhados uniformemente no espaço (caixa virtual ou grade). Por último, o espaço em torno dos confôrmeros é submetido a uma sonda química para o cálculo dos descritores 3D [24].

Os métodos mais utilizados que requerem o alinhamento das moléculas são o CoMFA (Análise comparativa dos campos moleculares, *Comparative Molecular Field Analysis*) e sua variante CoMSIA (Análise Comparativa de Índices de Similaridade Molecular, *Comparative Molecular Similarity Field Analysis*). A maior dificuldade apresentada na aplicação desses dois métodos é a dependência do alinhamento. Quando se conhece a estrutura do receptor, o alinhamento pode ser direcionado de acordo com o estabelecimento de interações entre o composto e receptor. Por outro lado, quando o alinhamento não é realizado de maneira adequada pode influenciar negativamente os resultados das análises [26].

A **abordagem VolSurf** (*Volume and Surface*) [26 – 28], é um método que não requer o alinhamento prévio das estruturas e os descritores não são influenciados com a translação e rotação das moléculas no espaço [24]. As vantagens desta abordagem são a geração de descritores 2D baseados nos campos de interação 3D, além de caracterizarem quantitativamente o tamanho, a forma, a polaridade e a hidrofobicidade das moléculas, assim como o equilíbrio entre estas propriedades [28].

Os campos de interação molecular (MIFs, *Molecular Interaction Fields*) podem ser calculados para qualquer molécula de estrutura 3D conhecida e descrevem a variação espacial da energia de interação entre um alvo molecular e uma sonda química. O alvo pode ser uma biomacromolécula ou um composto de baixo peso molecular, enquanto que a sonda molecular pode ser uma molécula ou um fragmento de uma molécula [26]. Existem diversos métodos para o cálculo dos MIFs, e, dependendo do procedimento computacional utilizado, assim como da natureza da sonda utilizada, os MIFs poderão

representar as energias de interação total (GRID), interação estéricas e/ou eletrostáticas (CoMFA), potencial lipofílico molecular (CoMPA, MLP), interações hidrofóbicas (HINT), entre outros [26].

Na abordagem VolSurf, os MIFs são calculados a partir do campo de força GRID, e o cálculo dos descritores de energia de interação em torno das moléculas presentes na grade virtual é realizada com sondas específicas, tais como: *i) OH2 (água)*: simula o processo de solvatação-desolvatação; *ii) DRY (hidrofóbico)*: calcula a energia de interação hidrofóbica e simula interações entre a molécula e a membrana, *iii) N1 (NH neutro)*: representa um nitrogênio de amida, simulando por exemplo, NH de ligações peptídicas; *iv) O (oxigênio carbonílico)*: simula interações entre a molécula e a membrana biológica, entre outras [26 – 30].

Os vetores resultantes da interação sonda-molécula, são utilizados para calcular os descritores definindo assim o volume e os mapas de contorno 3D da molécula [24, 27].

7.3.1 Descritores utilizados na abordagem VolSurf

A interação de moléculas com membranas biológicas é mediada por propriedades de superfície, tais como forma, forças eletrostáticas, ligações de H e hidrofobicidade [31]. Dessa forma, o campo de força GRID é utilizado como módulo integrante do programa VolSurf para calcular MIFs que irão representar potenciais áreas de interação polar e hidrofóbica em torno das moléculas [27 – 31]. As informações contidas nos MIFs são transformados para uma escala quantitativa em descritores referentes ao tamanho e forma moleculares, regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, momentos de energia de interação, entre outros [31].

Os **parâmetros** que descrevem a **forma e tamanho** das moléculas são: o volume molecular (**V**), que representa o volume acessível à sonda química OH2 (água), calculado a 0,20 kcal/mol; a superfície molecular (**S**), que representa a superfície acessível necessária para sonda água interagir a 0,20 kcal/mol com a molécula do soluto; a rugosidade (**R**), que é uma medida da superfície rugosa da molécula, definida pela relação de volume/superfície,

ou seja, quanto menor esta relação, maior a rugosidade; a globularidade molecular (**G**), definida por S/S_{equiv} (onde: S_{equiv} = área da superfície de uma esfera de volume V, e, S e V são a superfície e volume molecular acima descritos), em que 1,0 representa moléculas esféricas perfeitas. A globularidade é também relacionada com a flexibilidade molecular [30, 31].

Os **parâmetros de regiões hidrofílicas** são volumes hidrofílicos e fatores de capacidade. Os volumes hidrofílicos (**W1 – W8**) descrevem as regiões moleculares acessíveis e que atraem moléculas de água obtidos em oito níveis de energia (-0,2; -0,5; -1,0; -2,0; -3,0; -4,0; -5,0 e -6,0 kcal/mol). Geralmente, W1 – W4 consideram a polarizabilidade e forças de dispersão, enquanto que W5 – W8 consideram as interações polares e regiões doadoras e aceitadoras de ligações de hidrogênios. Os fatores de capacidade (**Cw1 – Cw8**) descrevem a relação entre regiões hidrofílicas na superfície molecular total, ou seja, a superfície hidrofílica por unidade de superfície. Assim como o volume hidrofílico, os fatores de capacidade são calculados nos mesmos oito níveis de energia [30, 31].

Os **parâmetros de regiões hidrofóbicas (D1 – D8)** são definidos quando a sonda química hidrofóbica interage com a molécula-alvo. As interações são obtidas em oito níveis de energia (-0,2; -0,4; -0,6; -0,8; -1,0; -1,2; -1,4 e -1,6 kcal/mol). Adicionalmente, seis novos descritores foram incluídos para descrever as regiões hidrofóbicas, denominados melhores volumes (**BV11, BV21, BV31, BV12, BV22 e BV32**) e calculados em níveis de energia de -1,0 a -3,0 kcal/mol [30].

Os **momentos de energia de interação (Interaction Energy (integy) Moments)** expressam o desequilíbrio entre o centro de massa de uma molécula e o baricentro da região hidrofílica ou hidrofóbica e são calculados em oito níveis de energia (-0,2; -0,5; -1,0; -2,0; -3,0; -4,0; -5,0 e -6,0 kcal/mol). Ao se referirem às regiões hidrofílicas, os *integy moments* (**Iw1 – Iw8**) são vetores que apontam do centro de massa para o centro das regiões hidrofílicas. Se o *integy moment* é elevado, as regiões hidratadas são claramente concentradas em somente uma área da superfície molecular, enquanto que no inverso, as porções polares das moléculas estão próximas ao centro de massa ou se equilibram em extremidades opostas da molécula. Quando se referem a regiões hidrofóbicas, os *integy*

moments (**ID1 – ID8**) expressam o desequilíbrio entre o centro de massa e o baricentro de regiões hidrofóbicas da molécula-alvo [30, 31].

Os **parâmetros de regiões doadoras e aceitadoras de ligações de H** são obtidos com a utilização das sondas *O* (oxigênio carbonílico) (**W01 – W06**) e *N1* (amida) (**WN1 – WN6**) respectivamente. Ambos parâmetros são calculados em seis níveis de energia (de -1,0 a -6,0 kcal/mol) [31]. Os descritores de ligações de H (**W01 – W06**) representam a capacidade da molécula em estabelecer interações do tipo ligações de H, dependendo da polaridade da sonda química utilizada e são obtidos a partir da diferença dos volumes hidrofílicos (**W1 – W8**) entre a água e a outra sonda incluída. De fato, a sonda de água (OH2) apresenta uma ótima capacidade para estabelecer ligações de H com a molécula-alvo, seja doando ou aceitando um ou mais hidrogênios. Se uma sonda diferente, de característica polar for utilizada, a interação pode não ser tão favorável devido à incapacidade desta sonda em aceitar ou doar prótons [30].

Os **parâmetros mistos** consideram as interações hidrofílicas e hidrofóbicas em conjunto [30, 31]. O descritor de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (**HL1 – HL2**) representa a razão entre regiões hidrofílicas e lipofílicas, descrevendo assim, qual o efeito é predominante na molécula-alvo. O momento anfifílico (**A**) é definido como um vetor que aponta do centro do domínio hidrofóbico para o centro do domínio hidrofílico. O comprimento desse vetor é proporcional à força do momento anfifílico e pode determinar a capacidade de um composto de permear a membrana. O descritor de empacotamento crítico (**CP**) é a relação entre a porção hidrofílica e lipofílica de uma molécula, mas em contraste ao equilíbrio hidrófilo-lipófilo, o parâmetro CP refere-se apenas à forma molecular [30, 31]. O empacotamento crítico é um bom parâmetro para descrever o empacotamento molecular, tais como, formação de micelas, e pode ser importante em estudos de solubilidade em que o ponto de fusão desempenha um papel importante [31].

Uma vez calculados, os MIFs obtidos a partir de uma série de compostos podem ser comparados visualmente e avaliados. Naturalmente, quando um grande número de compostos é estudado há limitações na representação gráfica de tais campos. Portanto, uma análise estatística usando métodos apropriados deve ser aplicada a fim de correlacionar os descritores de campo com a atividade biológica [26].

7.3.2 Modelos matemáticos utilizados na abordagem VolSurf

Nos estudos de QSAR-3D, geralmente o número de moléculas em estudo é muito inferior ao número de descritores gerados, e, além disso, estes descritores estão relacionados entre si, o que torna o método de regressão MLR inadequado para construir os modelos [3, 26]. O programa VolSurf utiliza da análise de componentes principais (PCA, *Principal Components Analysis*) e do método de regressão por quadrados mínimos parciais (PLS, *Partial Least Squares*) na redução da complexidade, na compressão de dados, assim como na interpretação dos resultados obtidos.

A **análise de componentes principais** tem o objetivo de reduzir a dimensão dos dados a partir das variáveis que são altamente correlacionadas, gerando assim, um novo conjunto de variáveis completamente não correlacionadas, denominadas de componentes principais (PCs) [2, 32]. As PCs são ortogonais entre si e descrevem a maioria das informações contidas nas variáveis independentes por ordem decrescente de variância, ou seja, a PC1 detém mais informação estatística que a PC2, que por sua vez tem mais informação estatística que a PC3 e assim por diante [33]. Dessa forma, apenas as primeiras PCs são necessárias para descrever a maioria das informações contidas no conjunto de dados originais [32].

Na abordagem PCA, a matriz X ($n \times k$, correspondente a n moléculas (linhas) e k descritores (colunas)) é decomposta em duas matrizes, T e L , equação 7.7 [32]:

$$X = TL^T \quad (\text{Eq. 7.7})$$

A matriz T (*matriz de escores*) corresponde ao escores, que descrevem as novas coordenadas de cada composto no novo sistema de coordenadas, enquanto que a matriz L (*matriz de pesos ou loadings*) corresponde ao peso ou influência de cada descritor original no novo conjunto de variáveis ou PCs [32, 34].

É importante ressaltar que o método de PCA não gera um modelo de QSAR, uma vez que busca as relações apenas em função das variáveis independentes [2]. Quando as PCs são empregadas como variáveis independentes para se relacionarem com uma variável

dependente, como atividade biológica por exemplo, e realizar uma regressão linear, o método é denominado de **regressão de componentes principais** (PCR, *Principal Component Regression*) [2].

O outro método empregado disponível no programa VolSurf é a **regressão por quadrados mínimos parciais**, que tem o objetivo de explicar a variável dependente (**y**) em termos de um número de variáveis preditivas (**X**), de acordo com a equação 7.8, onde **E** representa a matriz de resíduos [30].

$$y = f(X) + E \quad (\text{Eq. 7.8})$$

Na análise PLS são gerados novos conjuntos de variáveis independentes a partir da combinação linear das variáveis originais. As novas variáveis são denominadas variáveis latentes (VL) e utilizadas na previsão dos valores de **y**. As VLs são calculadas considerando os valores dos descritores e da variável dependente, usando desta forma, uma quantidade maior de informação na construção dos modelos [35]. Da mesma maneira que as PCs, as VLs são extraídas em ordem decrescente de importância, ou seja, a VL1 contém mais informações que a VL2 e assim sucessivamente. As VLs também são ortogonais entre si, não havendo assim, correlação entre as informações contidas nas VLs [30].

Assim como no método PCA, a análise PLS condensa toda a informação em duas matrizes: a matriz de escores que contém informações sobre as amostras ou objetos e a matriz de pesos (ou *loadings*) que contém informação sobre os descritores originais nas novas VLs [30]. Entretanto, diferente do método PCA, onde as PCs representam apenas a estrutura da matriz **X**, no método PLS, as VLs são responsáveis por representar as estruturas das matrizes **X** e **y**, assim como maximizar o ajuste entre **X** e **y**, mostrando-se um método mais apropriado para a construção de modelos quantitativos [30].

O método PLS permite a análise dos dados de uma forma mais realista e a interpretação mais efetiva dos resultados, considerando a influência das propriedades derivadas da estrutura molecular na atividade biológica [2]. Este é um dos métodos estatísticos mais utilizado para o desenvolvimento de modelos preditivos de QSAR-3D [2], e a capacidade preditiva dos modelos é avaliada por processos de validação interna, denominado validação cruzada (*leave-one-out*, LOO ou *leave-N-out*, LNO), que também

auxilia na determinação do número de VLs que devem ser incluídas ao modelo [30]. Neste método, são construídos modelos reduzidos, nos quais um ou mais compostos (objetos) são retirados e o modelo é reconstruído, e, a partir destes modelos reconstruídos, tenta-se prever a atividade dos compostos retirados. Em seguida, o valor de AB prevista (Y) é comparado como valor de AB experimental (Y') e os seguintes parâmetros estatísticos são avaliados para os modelos com número diferente de VLs consideradas nos mesmos [30]:

- **desvio padrão do erro de predição, SDEP** (*Standard Deviation of Errors of Prediction*), equação 7.9, onde N = número de objetos.

$$SDEP = \sqrt{\sum \frac{(Y - Y')^2}{N}} \quad (\text{Eq. 7.9})$$

- **coeficiente de correlação de validação cruzada, Q^2** : equação 7.10, onde $\bar{Y}$ = valor médio.

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum (Y - Y')^2}{\sum (Y - \bar{Y})^2} \quad (\text{Eq. 7.10})$$

A principal vantagem do emprego da validação cruzada é obter uma estimativa da capacidade previsão interna do modelo, sem a necessidade de valores externos, o que torna esta análise interessante em estudos de QSAR onde o número de compostos disponíveis para análise é pequeno [30]. Os processos de validação cruzada disponíveis no programa VolSurf são: LOO, onde os modelos são construídos com a remoção de um objeto de cada vez; e LNO, onde $N = 2$, ou seja, os modelos são construídos com a remoção de subconjuntos de dois objetos ou compostos de cada vez [30].

7.4 Objetivos

i) Desenvolver estudos de modelagem molecular para o cálculo de propriedades físico-químicas e estruturais dos compostos planejados;

ii) Desenvolver modelos de QSAR-2D e QSAR-3D empregando a análise de Hansch e a abordagem VolSurf, respectivamente.

7.5 Materiais e Métodos

Os estudos nesta fase do desenvolvimento do trabalho foram realizados em computadores com sistema operacional *Windows*¹ e *Red Hat Enterprise Linux*², envolvendo etapas de modelagem molecular, cálculo de descritores, construção e avaliação dos modelos de QSAR-2D e QSAR-3D. A Figura 7.2 mostra o fluxograma de trabalho empregado, com as etapas e procedimento adotados assim como os programas licenciados na execução dos cálculos.

Figura 7.2 – Fluxograma de trabalho.

[* ligante **7d**: 4-hidroxi[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida]

¹ Intel® Core™ i5, 2.40GHz, RAM 8.0 GB, NVIDIA® GeForce® GT 335M 1024 MB.

² Intel® Core2™ QUAD Q6600, 2,40GHz, RAM 4.0G, NVIDIA® GeForce® 9600GT 512MB.

7.5.1 Construção das moléculas e cálculo de propriedades moleculares

As estruturas tridimensionais dos vinte derivados benzofuroxanos (**7a - t**) ou ligantes, em suas formas neutras, foram construídas usando o programa *Hyperchem* 8.0³. A estrutura do ligante 4-hidroxi substituído (**7d**) foi referência para o desenho dos demais ligantes e foi construído a partir das coordenadas cartesianas da estrutura cristalografada da nifuroxazida e do anel benzofuroxano. As informações acerca da estrutura da nifuroxazida foi proveniente do banco de estruturas cristalinas do *Cambridge Structure Database* (código LEQTAC, fator R (R_{FATOR}) = 0,11) [36], e, as informações pertinentes à estrutura do sistema benzofuroxano foi extraída do arquivo tk2443.cif (fator R=0,035) [37].

A otimização de geometria do ligante **7d** foi realizada no programa *Hyperchem 8.0* com a utilização dos métodos de mecânica molecular MM+ (derivado do campo de força empírico MM2) [38], e de mecânica quântica semi-empírico Hamiltoniano AM1 (*Austim Model 1*) [39], seguido do cálculo de cargas atômicas parciais por este mesmo método.

O programa *MOLSIM 3.2*⁴ foi utilizado para minimização de energia e para a simulação de dinâmica molecular (DM) de 1 ns [1.000.000 passos, cada passo de 1 fs] a 310 K do ligante **7d**. Arquivo de trajetória foi salvo a cada 20 passos de simulação, resultando assim, em um perfil de amostragem conformacional (PAC) de 50.000 confôrmeros para o ligante **7d**. Para a conformação de energia mais baixa selecionada do PAC, a partir da equilibração do processo de simulação, novamente foi realizada a etapa de minimização de energia, em campo de força MM+ no programa *MOLSIM 3.2*.

A partir do confôrmero selecionado do ligante **7d**, os demais 19 compostos foram construídos no programa *Hyperchem 8.0*. Para as modificações referentes aos grupos substituintes foi realizada a otimização de geometria, utilizando a ferramenta “*Add H & Model Build*” apenas para as substituições, com intuito de preservar as coordenadas do restante da estrutura proveniente da simulação de DM. As cargas atômicas parciais foram calculadas com método AM1 no mesmo programa para cada ligante.

³ *Hyperchem 8.0.6*; Hypercube, Inc: 2008. Gainesville, FL, EUA.

⁴ *MOLSIM 3.2*; The Chem21 Group, Inc: 1997, Lake Forest, IL, EUA.

A próxima etapa do estudo de modelagem molecular foi o cálculo de carga de ponto único (*single point*), com cálculo de cargas e momentos de dipolos atômicos ajustados pelo potencial eletrostático (ChelpG, *Charges from Electrostatic Potentials using a Grid based method*) [40], empregando o método *ab initio* Hartree-Fock com conjunto de base 3-21G*, sem nenhuma restrição, implementados no programa *Gaussian 03W*⁵. Nesta mesma etapa, foram calculados os valores de energia dos orbitais de fronteira HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) e foram obtidos os mapas de potencial eletrostático (MEPs, *maps of electrostatic potential*) dos ligantes. Os mapas de potencial lipofílico (MLPs, *maps of lipophilicity potential*) e os valores de ClogP dos ligantes foram calculados no programa *Sybyl 8.0*⁶. Os mapas foram calculados em superfície molecular de Connolly, obtida com sonda de raio de 1,4 Å. O programa *MarvinBeans*⁷ foi utilizado para o cálculo de descritores de natureza hidrofóbica, estereoquímica, topológica e de polarizabilidade.

7.5.2 Estudos de QSAR-2D

A fim de identificar o efeito dos grupos substituintes sobre a atividade dos ligantes em *Staphylococcus aureus* e *Trypanosoma cruzi*, foram realizados estudos de QSAR-2D baseados na abordagem de Hansch. Os dados de atividade biológica, MIC e IC₅₀, foram ajustados para valores de potência (log₁/C) considerando a concentração molar, e correspondem à variável dependente. As variáveis independentes ou descritores, relacionadas com as contribuições hidrofóbicas, eletrônicas e estereoquímicas foram calculadas empregando os programas *Gaussian 03W*, *Sybyl 8.0* e *MarvinBeans*, além, de descritores empíricos relacionados aos grupos substituintes que foram obtidos de literatura [41, 42]. A Tabela 7.1 mostra a lista completa das variáveis independentes calculadas e obtidas da literatura, juntamente com suas descrições e outras informações relevantes.

⁵ *Gaussian 03W for Windows*, version 6; Gaussian Inc.: 1995-2003, Pittsburgh, PA, EUA.

⁶ *Sybyl 8.0 for Linux*; Tripos, Inc.: 2007. St. Louis, EUA.

⁷ *MarvinBeans*, version 5.0.4.1; ChemAxon Ltd.: 1998-2010, Budapeste, Hungria.

Tabela 7.1 – Descritores calculados e obtidos de literatura para os compostos investigados.

<i>descriptor</i>	<i>propriedade</i>	<i>descrição</i>	<i>programa</i>
ClogP _{SYBYL}	hidrofóbica	coeficiente de partição calculado	Sybyl 8.0
μ	eletrônica	momento de dipolo	
E_{HOMO}	eletrônica	energia do orbital de fronteira HOMO	
E_{LUMO}	eletrônica	energia do orbital de fronteira LUMO	
GAP	eletrônica	diferença entre E _{HOMO} e E _{LUMO}	
ChelpG_C2	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de carbono substituído em posição <i>para</i> do anel benzênico (R ₁)	Gaussian 03W
ChelpG_C3	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de carbono substituído em posição <i>meta</i> do anel benzênico (R ₂)	
ChelpG_C4	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de carbono substituído em posição <i>orto</i> do anel benzênico (R ₃)	
ChelpG_C7	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de carbono carbonílico	
ChelpG_O8	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio carbonílico	
ChelpG_N19	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de nitrogênio da ligação N→O	
ChelpG_O22	eletrônica	carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio da ligação N→O	
ClogP _{MB}	hidrofóbica	coeficiente de partição calculado	
VW	estereoquímica	volume de Van der Waals	
PSA	estereoquímica	área de superfície polar	
Dreiding	estereoquímica	energia relacionada com a estabilidade da conformação da molécula.	
ASA	estereoquímica	superfície acessível a solvente, calculada usando o raio do solvente (1,4 Å para a molécula de água).	
ASA+	estereoquímica	superfície acessível a solvente de todos os átomos com carga parcial positiva.	MarvinBeans
ASA-	estereoquímica	superfície acessível a solvente de todos os átomos com carga parcial negativa.	
ASA_h	estereoquímica	superfície acessível a solvente de todos os átomos hidrofóbicos.	
ASA_p	estereoquímica	superfície acessível a solvente de todos os átomos hidrofílicos.	
MR_{MB}	polarizabilidade	refratividade molar da molécula	
TSEL₁	topológica	índice de efeito estérico topológico do grupo substituinte em posição <i>para</i> do anel benzênico (R ₁)	
TSEL₂	topológica	índice de efeito estérico topológico do grupo substituinte em posição <i>meta</i> do anel benzênico (R ₂)	
TSEL₃	topológica	índice de efeito estérico topológico do grupo substituinte em posição <i>orto</i> do anel benzênico (R ₃)	
Π	hidrofóbica	constante Π de Hansch	
σ	eletrônica	constante σ de Hammet	
$\mathcal{F}$	eletrônica	constante de efeito indutivo de Swain e Lupton	
$\mathcal{R}$	eletrônica	constante de efeito de ressonância de Swain e Lupton	
L	estereoquímica		refs. [41] e [42]
B1	estereoquímica	parâmetros de STERIMOL , desenvolvidos por Verloop	
B5	estereoquímica		
MR	polarizabilidade	refratividade molar	

Os valores dos descritores da série completa de compostos estão listados no *Anexo 4*, “Valores dos descritores calculados e obtidos da literatura para os compostos estudados”. Devido às diferentes ordens de grandeza dos descritores calculados foi utilizado o pré-

processamento de autoescalamamento de dados no tratamento dos valores dos descritores, equação 7.13 [26].

$$X_{ij} = \frac{X_{ij} - \bar{X}_j}{\sigma_j} \quad (\text{Eq. 7.13})$$

Onde: X_{ij} é o valor do descritor j para o composto i ; $\bar{X}_j$ é a média dos valores para o descritor j e σ_j é o desvio padrão dos valores para o descritor j .

Os estudos de QSAR-2D foram realizados no programa *BuildQSAR*⁸ [43], o qual emprega o método de regressão linear múltipla na construção dos modelos matemáticos. O critério inicial de seleção de variáveis para a construção dos modelos de QSAR foi a análise de dispersão dos descritores em função da atividade biológica (figura 7.3) [44]. Este critério de seleção considera tanto as correlações lineares (figura 7.3A) quanto as não-lineares (figura 7.3B), e os descritores descartados da análise são aqueles que não apresentam dispersão no gráfico (figura 7.4C).

Figura 7.3 – Gráfico de dispersão de descritor hipotético X em função da atividade biológica Y . Em (A) correlação linear, em (B) correlação não-linear e em (C) ausência de correlação.

O segundo critério de seleção de variáveis foi realizado a partir de busca sistemática considerando 2 e 3 variáveis independentes e a qualidade dos modelos gerados, em relação às atividades em *S. aureus* e *T. cruzi*. Os parâmetros ou medidas estatísticas considerados na avaliação foram o coeficiente de determinação (R^2), o desvio-padrão (s), o teste de Fischer (F) e, para modelos lineares, os coeficientes de validação cruzada LOO (Q^2) e LNO (Q^2_{LNO}).

⁸ *BuildQSAR version 2.1.0.0*; Federal University of Espírito Santo, 2009.

7.5.3 Estudos de QSAR-3D

Os estudos de QSAR-3D foram realizados com o módulo *VolSurf* da plataforma *Sybyl8.0*. O procedimento adotado nesta etapa iniciou-se com a geração dos campos de interação moleculares (MIFs) para os dois conjuntos de compostos (um conjunto referente à atividade em *S. aureus* composto de 16 ligantes e outro, composto de 18 ligantes que apresentaram atividade em *T. cruzi*). Os MIFs foram gerados em campo de força GRID com espaçamento padrão da caixa tridimensional (0,5 Å de resolução de aresta) a partir das interações de combinações de sondas químicas OH2, DRY, O e N1. Estas sondas foram combinadas entre duas, três e quatro, nas quais as sondas OH2 e DRY estiveram presentes em todas as combinações. Dessa forma, o número de descritores 2D gerados a partir dos MIFs variou de acordo com a combinação de sondas elegida. Calcularam-se, também, seis descritores não relacionados com o uso de sondas químicas [30]: polarizabilidade (*POL*); alongamento (*ELON*) e alongamento fixo (*EEFR*); coeficiente de partição (*LogP*); difusividade (*DIFF*) e massa molecular (*MW*).

Após a geração das matrizes com os descritores 2D, os dados de atividade biológica em valores de potência foram inseridos no programa e a metodologia estatística de PLS foi utilizada para gerar os modelos.

A seleção de variáveis foi realizada aplicando o método de planejamento fatorial fracionário (FFD, *Factorial Fractional Design*) que é utilizado para detectar as variáveis responsáveis por melhorar a capacidade preditiva dos modelos PLS. Os modelos obtidos usando somente variáveis selecionadas pelo método FFD são mais preditivos do que os modelos com todas as variáveis [30]. O método FFD envolve os seguintes passos: *i*) construção de um modelo PLS utilizando todas as variáveis e seleção da dimensionalidade (número de VLs) que produz o modelo mais preditivo; *ii*) construção de um grande número de modelos reduzidos, semelhante ao modelo completo, mas com a remoção de algumas variáveis. A capacidade preditiva de cada modelo é avaliada utilizando a validação cruzada (LOO e LNO, $N = 2$) e, a partir desses valores, o método FFD relaciona a capacidade preditiva do modelo com a presença ou ausência de cada variável independente X ; *iii*) por fim, ocorre

a remoção do conjunto de dados das variáveis que não melhoram a capacidade preditiva do modelo [30].

Após a seleção do modelo mais significativo, a qualidade do mesmo é avaliada a partir da interpretação de gráficos bidimensionais e as contribuições dos descritores é analisada a partir dos gráficos de coeficientes do modelo selecionado.

7.6 Resultados e Discussão

7.6.1 Construção das moléculas e cálculo de propriedades moleculares

A molécula do composto **7d** ($R_1 = \text{OH}$) foi eleita como molde para desenhar as demais dezenove moléculas dos compostos que compõem a série planejada. Para sistemas em que não existe qualquer informação sobre o sítio de interação do alvo é procedimento bem estabelecido considerar uma classe de moléculas similares que interagem no sítio receptor do mesmo modo, adotando geometria e orientação semelhantes [45]. Sendo assim, a molécula do composto **7d** foi selecionada como molde e foi construída a partir das coordenadas cartesianas das estruturas da nifuroxazida e do sistema benzofuroxano disponíveis a partir de dados cristalográficos, figura 7.4.

Figura 7.4 – Estruturas químicas da nifuroxazida, benzofuroxano e composto **7d**. Em destaque, os átomos utilizados como referência na construção do modelo molecular 3D do composto **7d**.

Após a construção do modelo molecular 3D do composto **7d** e das etapas de otimização de geometria e cálculo de cargas atômicas parciais, simulações de DM foram empregadas para gerar o PAC com finalidade de selecionar a conformação de energia mais baixa. Geraram-se 50.000 confôrmeros e os que apresentaram valores de energia mais baixa foram selecionados para estudo de sobreposição, que traduz similaridades e diferenças nos confôrmeros analisados. O valor de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) representa o desvio padrão das posições atômicas e a informação obtida a partir deste valor é a posição dos átomos nos modelos moleculares considerados [46]. Desta forma, quanto menor o valor de RMSD, maior a integridade estrutural entre as conformações, ou seja, menor a distância em Å das posições atômicas entre os modelos moleculares investigados no procedimento de busca conformacional. A figura 7.5 ilustra os átomos da nifuroxazida (figura 7.5A) selecionados no cálculo de sobreposição para a escolha do confôrmero de energia mais baixa da DM (Figura 7.5B). O valor de RMSD foi de 0,09Å quando sobreposto o confôrmero selecionado da DM com a estrutura cristalografada da nifuroxazida, o que indica uma variação não significativa das posições atômicas na região considerada para o composto **7d** após o procedimento de DM (o composto manteve a integridade estrutural no fragmento considerado). Os dados de valores de energia do confôrmero selecionado encontram-se na tabela 7.2.

Figura 7.5 – Modelos moleculares 3D da nifuroxazida (dados cristalografados) (A) e do composto **7d** (B). (★) = átomos utilizados na sobreposição e cálculo dos valores de RMSD.

[Os modelos moleculares estão apresentadas no modelo tubo (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul e hidrogênios em branco). nifuroxazida: 5-nitro-2-furfurilideno-4-hidroxi-benzidrazida; compostos **7d**: 4-hidroxi[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida]

Tabela 7.2 – Valores das contribuições de energia resultantes da simulação de DM de 1 ns a 310K para o *confômero* selecionado.

<i>confômero</i>	$E_{STRETCH}$	E_{BEND}	E_{TORS}	E_{1-4}	E_{VDW}	E_{CHARGE}	E_{SOLV}	E_{HBD}	E_{TOT}
7d	8,62	16,94	-6,44	-1,11	0,60	3,10	-9,38	-3,27	9,05

* As unidades dos valores de energia são em kcal/mol. $E_{STRETCH}$ = contribuição de energia de deformação axial; E_{BEND} = contribuição de energia de deformação angular; E_{TORS} = contribuição de energia de deformação torsional; $E_{1,4}$ = contribuição de energia de interações do tipo 1-4; E_{VDW} = contribuição de energia de van der Waals; E_{CHARGE} = contribuição de energia eletrostática; E_{SOLV} = contribuição de energia de solvatação; E_{HBD} = contribuição de energia de ligação H; E_{TOT} = energia potencial total.

Uma vez selecionado o “*confômero-molde*”, a etapa subsequente à DM, foi a minimização de energia em campo de força empírico MM+ [47]. A partir da estrutura minimizada do ligante **7d** foram construídas as moléculas dos compostos **7a – t**. Apenas nas regiões modificadas (R₁, R₂ e R₃) procedeu-se com novas otimizações de geometria em campo de força empírico MM+ e método AM1, sem quaisquer restrições.

A próxima etapa dos estudos de modelagem molecular foi o cálculo de carga de ponto único realizado com método *ab initio* Hartree-Fock e conjunto de base 3-21G*, sem quaisquer restrições, afim de obter informações acerca das características eletrônicas dos ligantes. O algoritmo ChelpG foi utilizado para calcular o potencial eletrostático das moléculas [40]. Este método tem o objetivo de avaliar cargas atômicas pontuais que representam de maneira satisfatória o potencial eletrostático molecular em um conjunto de pontos pré definidos ao redor da molécula [48]. O conhecimento do potencial eletrostático mostra-se necessário em estudos que envolvem interações moleculares e reações químicas, uma vez que o contato inicial entre duas moléculas surge a partir de forças de interação eletrostáticas de longo alcance [49]. Os MEPs calculados em superfície molecular de Connolly, são exemplificados na figura 7.6 considerando os compostos que apresentaram maior e menor atividade em *T. cruzi* (**7q**, R₁ = I; MIC = 26,2 – 23,6 µg/mL; %IC₅₀ = 6,11 µM e **7c**, R₁ = NH₂; MIC = 17,0 – 15,3 µg/mL; %IC₅₀ = 116,96 µM, respectivamente) e o composto não-substituído (**7a**; R₁ = H; MIC = 18,0 – 16,2 µg/mL; %IC₅₀ = 16,92 µM). A interpretação destes mapas é por meio de um esquema de cores, neste caso, em uma faixa de -0,08 (vermelho intenso; regiões de maior distribuição de densidade eletrônica) a 0,08 (azul intenso; regiões de menor distribuição de densidade eletrônica).

Figura 7.6 – Mapas de potencial eletrostático dos compostos **7a**, **7c** e **7q** utilizando *GaussView 3.0*⁹.

[Coloração vermelha indica regiões de maior distribuição de densidade eletrônica (-0,08) e coloração azul denota regiões de menor distribuição de densidade eletrônica(0,08); as moléculas são exibidas no modelo tubo (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, iodo em roxo e os átomos de hidrogênio são apresentados em branco). composto **7a**: [N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida; composto **7c**: 4-amino[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida; composto **7q**: 4-iodo[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno] benzidrazida]

Observa-se que as regiões da carbonila e do oxigênio do grupo *N*-óxido são ricos em elétrons (coloração vermelha nas superfícies moleculares). A inclusão de átomos doadores de elétrons ao anel benzênico, exemplificado pelo composto **7c** ($R_1 = \text{NH}_2$), aumenta consideravelmente a densidade eletrônica na porção carbonílica. Por outro lado, a inclusão de átomos retiradores de elétrons, tais como no composto **7q** ($R_1 = \text{I}$), promove um pequeno deslocamento da densidade eletrônica no anel benzênico, observado em coloração verde e atribuída às características do grupo substituinte. Nota-se também, que a porção carbonílica, apresenta uma densidade eletrônica menor em comparação aos compostos **7a** e **7c**. Na região do sistema benzofuroxano, as características eletrônicas são similares para os três compostos.

A partir dessas observações foram analisadas as cargas parciais atômicas ChelpG dos átomos de carbono substituído em posição *para*, *meta* e *orto* do anel benzênico, dos átomos de carbono e oxigênio carbonílicos e estes valores de carga foram utilizados como descritores nos estudos de QSAR afim de explorar esta propriedade eletrônica. Os átomos

⁹ *GaussView 3.0*; Gaussian Inc.: 1995-2003, Pittsburgh, PA, EUA.

de nitrogênio e oxigênio da ligação N→O do sistema benzofuroxano também foram selecionados por suas prováveis participações no processo de biorredução responsáveis pela atividade anti-*T. cruzi* [50 – 53]. A tabela 7.3 apresenta os dados das cargas parciais referentes aos compostos **7a**, **7c** e **7q**, enquanto que os valores para os demais compostos encontram-se disponíveis no Anexo 4.

Tabela 7.3 – Valores de cargas ChelpG (eV) dos compostos **7a**, **7c** e **7q**.

composto	C ₂	C ₃	C ₄	C ₇	O ₈	N ₁₉	O ₂₂
7a	-0,0980	-0,1368	-0,0563	0,7023	-0,5693	0,6053	-0,0914
7c	0,7617	-0,5104	0,0980	0,7969	-0,6164	0,5970	-0,0843
7q	-0,0333	-0,278	-0,1312	0,7505	-0,5848	0,6058	-0,0853

Os valores de cargas ChelpG para os três compostos exemplificados demonstram que não ocorre uma grande variação entre os valores calculados para os átomos N₁₉ e O₂₂. Este comportamento é observado para a série em geral, onde foram encontrados valores de cargas atômicas para o N₁₉ entre 0,5827 e 0,6247 eV (referente aos compostos dissustituídos **7s** (R₁ = Cl; R₂ = Cl) e **7t** (R₁ = NO₂, R₂ = CF₃), respectivamente, e valores para O₂₂ entre -0,0938 e -0,0819 eV (referente aos mesmos dois compostos dissustituídos). Da mesma maneira, ocorreu uma pequena variação referente aos átomos da porção carbonílica C₇ e O₈.

A maior variação é observada nos átomos de carbonos substituídos do anel benzênico, reflexo da inserção de grupos doadores e retiradores de elétrons do sistema. O valor de C₂ variou entre -0,2327 eV (**7n**, R₁ = CF₃) e 0,7617 eV (**7c**), enquanto que os valores de cargas de C₃ oscilaram entre -0,5820 eV (**7t**) e 0,0632 eV (**7s**), e para as cargas de C₄ entre -0,1328 eV (**7m**, R₁ = NO₂) e 0,0980 eV (**7c**).

A partir dos cálculos de cargas atômicas parciais foram obtidos os valores de momento de dipolo total, que apresentaram variação de 5,63 a 14,58 Debye, referente aos compostos **7m** ($R_1 = \text{NO}_2$) e **7k** ($R_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$). Foi considerado para análise de QSAR apenas o valor de dipolo, ou seja, o valor do vetor resultante dos momentos de dipolo parciais em cada eixo (x, y e z) da molécula.

As energias dos orbitais de fronteira HOMO (orbital molecular ocupado de maior energia) e LUMO (orbital molecular desocupado de menor energia) também foram investigadas nos cálculos de carga de ponto único. Estas duas propriedades eletrônicas fornecem informações sobre o caráter elétron-doador e/ou elétron-aceitador de um composto e, conseqüentemente, a formação de um complexo de transferência de carga [54]. A energia do HOMO (E_{HOMO}) está relacionada com o potencial de ionização e mede o caráter elétron-doador de um composto, ou seja, sua suscetibilidade de sofrer um ataque por eletrófilos, enquanto que a energia do LUMO (E_{LUMO}) está relacionada com a afinidade química e mede o caráter elétron-aceitador de um composto, em outras palavras, a suscetibilidade de sofrer um ataque por nucleófilos [54]. Desta forma, quanto maior a energia do HOMO, maior a capacidade elétron-doadora e, quanto menor a energia do LUMO menor será a resistência para aceitar elétrons [54]. Quanto maior a diferença (*gap*) entre valores de E_{HOMO} e E_{LUMO} maior é a estabilidade química da molécula e sua reatividade em reações químicas será menor [54].

Em conjunto com o momento de dipolo, a E_{LUMO} tem demonstrado ser uma propriedade eletrônica relevante no entendimento das relações de compostos que contém o grupamento $\text{N} \rightarrow \text{O}$ com a atividade anti-*T. cruzi*, uma vez que esta propriedade está diretamente relacionada à capacidade da molécula de receber um elétron para que ocorra a redução do grupo *N*-óxido [55].

A variação observada nos valores de E_{HOMO} foi de 7,92 a 8,35 eV, valores estes, referentes aos compostos **7c** ($R_1 = \text{NH}_2$; MIC = 17,0 – 15,3 $\mu\text{g/mL}$; %IC₅₀ = 116,96 μM) e **7m** ($R_1 = \text{NO}_2$; MIC = 24,3 – 21,9 $\mu\text{g/mL}$; %IC₅₀ = 17,84 μM), respectivamente, enquanto que a variação observada nos valores de E_{LUMO} foi de -1,65 a 0,29 eV, referentes aos compostos **7m** ($R_1 = \text{NO}_2$; MIC = 24,3 – 21,9 $\mu\text{g/mL}$; %IC₅₀ = 17,84 μM) e **7k** ($R_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$; MIC = não determinado; %IC₅₀ = inativo), respectivamente. Os mapas de distribuição de orbitais

moleculares considerando os compostos que apresentaram maior e menor atividade em *T. cruzi* (**7q** e **7c**, respectivamente) e o composto não-substituído (**7a**) são apresentados na figura 7.7.

Figura 7.7 – Mapas de distribuição de orbitais moleculares de HOMO (A) e LUMO (B) calculados com o método HF/3-21G* para os compostos **7a**, **7c** e **7q**, respectivamente, utilizando o programa GaussView 3.0.

[A isossuperfície calculada foi de 0,032 eV. As moléculas são exibidas em modelo tubo (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, iodo em roxo e os átomos de hidrogênio são apresentados em branco). composto **7a**: [N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida; composto **7c**: 4-amino[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida; composto **7q**: 4-iodo[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno] benzidrazida]

A principal diferença visualizada nos mapas de E_{HOMO} (figura 7.7A) é a presença de grupos doadores de elétrons, que faz com que os orbitais moleculares de HOMO encontrem-se distribuídos por quase toda a molécula, como pode ser observado para o composto **7c**. A inclusão de grupos retiradores de elétrons (**7q**) faz com que os orbitais moleculares de HOMO concentrem-se na região da carbonila até o sistema benzofuroxano, semelhante ao composto não substituído (**7a**). Comportamento inverso é observado nos mapas de orbitais moleculares de LUMO (figura 7.7B), onde tais orbitais encontram-se distribuídos na região da carbonila até o sistema benzofuroxano quando grupos doadores de elétrons encontram-se ligados no anel benzênico e distribuída por quase toda a molécula para os composto **7a** e **7q**.

Estudos de modelagem molecular também foram realizados para explorar as propriedades hidrofóbicas dos compostos, a partir de seus mapas de potencial lipofílico e

cálculo de valores de coeficiente de partição (ClogP), empregando o método de Ghose-Crippen implementado no pacote Sybyl8.0. A figura 7.8 ilustra os mapas calculados em superfície molecular de Connolly e valores de ClogP para os compostos que apresentaram menor (**7c**) e maior (**7q**) atividade anti-*T. cruzi*. Os mapas resultantes foram analisados de acordo com as variações de cores, que variam em uma faixa de marrom (0,17; região mais lipofílica) a azul (-0,17; região mais elevada hidrofílica). O esquema de cores mostra-se de fácil interpretação onde azul é associado com a água e marrom como o óleo [56]. Nota-se a variação da hidrofobicidade mais acentuada na região do anel benzênico onde ocorre a substituição molecular, sendo portanto, uma característica do grupo substituinte.

Figura 7.8 – Mapas de potencial lipofílico dos compostos **7c** e **7q**, respectivamente, utilizando o programa Sybyl 8.0.

[Coloração marrom indica regiões hidrofóbicas (0,17) e coloração azul denota áreas hidrofílicas (-0,17); as moléculas são exibidas no modelo tubo (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, iodo em roxo e os átomos de hidrogênio são apresentados em ciano). composto **7c**: 4-amino[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida; composto **7q**: 4-iodo[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno] benzidrazida]

Por fim, as propriedades stereoquímicas, topológicas de polarizabilidade foram calculadas no programa MarvinBeans e a matriz de variáveis independentes foi complementada com as constantes e parâmetros referentes a grupos substituintes obtidos de dados da literatura.

7.6.2 Estudos de QSAR-2D

Os estudos de QSAR-2D foram realizados considerando as duas atividades biológicas investigadas neste trabalho. Os dados de atividade biológica, MIC e IC₅₀, foram ajustados para valores de potência (log1/C) considerando a concentração molar, e usados como variável dependente (AB_{SA} e AB_{TC} respectivamente), tabela 7.4.

Tabela 7.4 – Valores de potência referente a atividade frente a *S. aureus* e a *T. cruzi* de R_1, R_2, R_3 -[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazidas.

	R ₁	R ₂	R ₃	Massa molar	AB em <i>S. aureus</i>			AB em <i>T. cruzi</i>		
					MIC µg/mL (fase II)	C (M)* x10 ⁻⁵	AB _{SA} log 1/C	IC ₅₀ µM	C (M) x 10 ⁻⁵	AB _{TC} log 1/C
7a	H	H	H	282,08	18,0 – 16,2	6,38	4,20	16,92	1,69	4,77
7b	CH ₃	H	H	296,09	23,3 – 21,0	7,87	4,10	11,86	1,19	4,93
7c	NH ₂	H	H	297,09	17,0 – 15,3	5,72	4,24	116,96	11,70	3,93
7d	OH	H	H	298,07	29,1 – 26,2	9,76	4,01	–	–	–
7e	F	H	H	300,07	16,2 – 15,3	5,40	4,27	15,29	1,53	4,82
7f	CN	H	H	307,07	29,1 – 26,2	9,48	4,02	26,58	2,66	4,58
7g	CH ₂ CH ₃	H	H	310,11	–	–	–	9,91	0,99	5,00
7h	OCH ₃	H	H	312,09	18,0 – 16,2	5,77	4,24	13,2	1,32	4,88
7i	Cl	H	H	316,04	17,0 – 15,3	5,38	4,27	9,96	1,00	5,00
7j	COCH ₃	H	H	324,09	23,6 – 21,2	7,28	4,14	16,01	1,60	4,80
7k	N(CH ₃) ₂	H	H	325,12	–	–	–	–	–	–
7l	OCH ₂ CH ₃	H	H	326,31	–	–	–	9,62	0,96	5,02
7m	NO ₂	H	H	327,06	24,3 – 21,9	7,43	4,13	17,84	1,78	4,75
7n	CF ₃	H	H	350,06	14,6 – 13,1	4,17	4,38	9,62	0,96	5,02
7o	Br	H	H	359,99	20,0 – 18,0	5,56	4,26	7,78	0,78	5,11
7p	SO ₂ NH ₂	H	H	361,05	–	–	–	60,38	6,04	4,22
7q	I	H	H	407,97	26,2 – 23,6	6,42	4,19	6,11	0,61	5,21
7r	Cl	H	Cl	350,00	27,0 – 24,3	7,71	4,11	9,54	0,95	5,02
7s	Cl	Cl	H	350,00	13,1 – 11,8	3,74	4,43	9,07	0,91	5,04
7t	NO ₂	CF ₃	H	395,05	11,4 – 10,3	2,89	4,54	15,93	1,59	4,80

*: Na determinação de potência (log 1/C), o maior valor da faixa de MIC foi convertido em molaridade.

O pré-tratamento dos dados foi o autoescalamiento dos valores das variáveis independentes. Os estudos de QSAR-2D serão discutidos separadamente de acordo com a atividade biológica investigada.

7.6.2.1 Estudos de QSAR-2D para atividade em *S. aureus*

A matriz de dados foi inserida no programa BuildQSAR e o primeiro critério de seleção de descritores adotado foi a análise de dispersão, onde os descritores que não apresentaram nenhuma correlação com a AB_{SA} foram desconsiderados na análise, figura 7.9. Esta ferramenta reduziu o número de variáveis independentes de 33 para 27.

Figura 7.9 – Gráfico de dispersão dos descritores retirados da análise de QSAR-2D.

[AB_{SA} = atividade em *S. aureus* ($\log 1/C$); E_{LUMO} = energia do orbital de fronteira LUMO; GAP = diferença entre E_{HOMO} e E_{LUMO} ; PSA = área de superfície polar; Dreiding = energia relacionada com a estabilidade da conformação da molécula; TSEI_2 = índice de efeito estérico topológico do grupo substituinte em posição meta do anel benzênico (R2); TSEI_3 = índice de efeito estérico topológico do grupo substituinte em posição orto do anel benzênico (R3).]

Dentre as 27 variáveis independentes mantidas na análise, a propriedade estereoquímica superfície acessível ao solvente de todos os átomos com carga parcial negativa (ASA^-) apresentou o maior valor de correlação linear com a AB_{SA} , $r=0,70$.

Foi aplicado o método de busca sistemática para selecionar as melhores correlações considerando duas e três variáveis independentes em função da AB_{SA} , descartando todas

combinações que apresentassem coeficiente de intercorrelação $> 0,6$. Não foi gerado nenhum modelo de QSAR estatisticamente válido. Para exemplificar, dois modelos (equações 7.14 e 7.15) são discutidos:

$$\log 1/C = +0,09 (\pm 0,06) ASA_p + 0,10 (\pm 0,05) \pi - 0,05 (\pm 0,06) \mu + 4,23 (\pm 0,05) \quad (\text{Eq. 7.14})$$

$$n = 16 ; R^2 = 0,66 ; s = 0,09 ; F = 7,73 ; Q^2 = 0,39$$

$$ASA_p \text{ versus } \pi, r = 0,13; ASA_p \text{ versus } \mu, r = 0,51; \pi \text{ versus } \mu = 0,22$$

A equação 7.14 foi eleita por apresentar o maior valor de coeficiente de validação cruzada *leave-one-out*, Q^2 de todos os modelos gerados na busca sistemática considerando três variáveis, entretanto, apresentou valor $< 0,5$. Nesta equação não foi identificada nenhuma amostra atípica ou *outlier* porém, apresentou baixo valor no teste Fischer, além de, o coeficiente de regressão obtido para o descritor μ apresentar uma variação maior do que o próprio valor do coeficiente, o que torna esta equação estatisticamente não significativa. Considerando duas variáveis independentes na busca sistemática, a equação obtida foi a seguinte:

$$\log 1/C = +0,06 (\pm 0,05) ASA_p + 0,08 (\pm 0,05) \pi + 4,22 (\pm 0,05) \quad (\text{Eq. 7.15})$$

$$n = 16 ; R^2 = 0,57 ; s = 0,09 ; F = 8,58 ; Q^2 = 0,31$$

$$ASA_p \text{ versus } \pi, r = 0,13$$

A equação 7.15 foi a que apresentou o maior valor de coeficiente de predição Q^2 , entretanto $< 0,5$. Novamente, não foram identificados compostos *outliers*, obteve-se um baixo valor no teste Fischer assim como, coeficiente de determinação $R^2 < 0,6$.

Foram investigados também possíveis correlações não-lineares, porém nenhum modelo estatisticamente válido foi obtido. Esta falta de significância dos modelos pode ser atribuída à estreita faixa de distribuição de valores de atividade entre o composto mais e menos ativo (4,59 a 4,01). A obtenção de modelos preditivos é facilitada em séries que apresentam maiores intervalos de atividade (geralmente > 2 unidades de log) [6].

Desta forma, faz-se necessário a ampliação da série de compostos, assim como, adequar o método de determinação da atividade biológica, uma vez que, os resultados obtidos para os compostos **7g** ($R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$), **7k** ($R_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$), **7l** ($R_1 = \text{OCH}_2\text{CH}_3$) e **7k** ($R_1 = \text{SO}_2\text{NH}_2$) não esclarecem se eles são inativos, ou se apresentam uma baixa atividade. A faixa de MIC poderia ser determinada para altas concentrações, mas este procedimento foi inviabilizado neste estudo por conta da falta de solubilidade dos compostos mencionados nos meios de cultura utilizados nos ensaios frente a *S. aureus*. Para esta última situação, estudo com outros solventes, em substituição ao DMSO, poderia ser uma alternativa viável.

7.6.2.2 Estudos de QSAR-2D para atividade em *T. cruzi*

O critério de exclusão das variáveis independentes em função da AB_{TC} resultou na retirada dos mesmos seis descritores (E_{LUMO} ; GAP; PSA; Dreinding; TSEI_2 e TSEI_3) observados anteriormente em função da AB_{SA} na matriz de dados. A constante de grupo π **de Hansch** apresentou o maior valor de correlação com AB_{TC} , $r = 0,87$. A busca sistemática considerando três variáveis independentes em função da AB_{TC} resultou em um modelo linear (equação 7.16), onde estão relacionadas propriedades hidrofóbicas (π **de Hansch**), eletrônicas (μ) e estereoquímicas (ASA_h).

$$\log 1/C = 0,21 (\pm 0,06) \pi - 0,12 (\pm 0,07) \mu + 0,15 (\pm 0,07) \text{ASA}_h + 4,83 (\pm 0,06) \quad (\text{Eq. 7.16})$$

$$n = 18; R^2 = 0,90; s = 0,11; F = 42.14; Q^2 = 0,77$$

$$\pi \text{ versus } \mu, r = 0,10; \pi \text{ versus } \text{ASA}_h, r = 0,36; \mu \text{ versus } \text{ASA}_h = 0,49$$

O descritor π **de Hansch** é a constante de grupo que mede a contribuição individual de um determinado grupo substituinte para o coeficiente de partição da molécula [8]. A hidrofobicidade é a propriedade físico-química relacionada com a capacidade de um composto difundir-se através da membranas biológicas e chegar ao seu local de ação. O

coeficiente de regressão positivo de π sugere que a atividade dos compostos aumenta com o aumento de hidrofobicidade dos grupos substituintes.

O momento de dipolo (μ) é uma propriedade que mede a carga deslocalizada quando átomos de eletronegatividade diferentes são interligados. Grupos substituintes que apresentam eletronegatividade distintas alteram as propriedades moleculares de um composto, tais como acidez e basicidade, de forma que o momento de dipolo pode esclarecer dúvidas sobre a reatividade do mesmo [54]. O coeficiente negativo de μ indica que a atividade dos compostos aumenta com a diminuição da polaridade (menor momento de dipolo) dos compostos. Este mesmo comportamento foi observado em estudos realizados por BOIANI e colaboradores [55], que observaram que derivados benzofuroxânicos com atividade anti-*T. cruzi* apresentavam menores valores de μ do que os compostos menos ativos, indicando assim, a importância da polaridade em moléculas com este sistema.

O descritor **ASA_h** é dependente da conformação e das cargas parciais da molécula, e refere-se a superfície acessível ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos, ($|q_i| < 0,125$; onde $|q_i|$ é o valor absoluto da carga parcial do átomo), obtida pela passagem de uma molécula de água (sonda) com raio de 1,4 Å, que percorre a superfície total do ligante [57]. O descritor **ASA_h** fornece informações relevantes uma vez que sugere a existência de interações hidrofóbicas e/ou de van der Waals entre os compostos e um provável sítio receptor. MERLINO e colaboradores [58] demonstraram a existência de ligações assistidas por interações hidrofóbicas entre o anel benzofuroxano com resíduos de aminoácidos da enzima cruzipaina. A cruzipaina é uma cisteína protease que desempenha papel no processo de internalização do *T. cruzi* em células de mamíferos e mostra-se essencial para a sobrevivência do parasito. A inibição enzimática interfere na invasão celular e replicação do parasito [59].

A diferença entre os valores experimentais (Y_{exp}) e calculados (Y_{calc}) de AB (valores de resíduo) utilizando a equação 7.16 é apresentada na tabela 7.9, juntamente com o gráfico de Y_{exp} versus Y_{calc} . O gráfico de dispersão demonstra a ausência de *outliers* no modelo. Seriam considerados como *outliers* os compostos cujos valores de resíduo (em

módulo) fossem maiores do que dois desvios da média dos resíduos (limite de confiança de 95 %).

Tabela 7.5 – Valores experimentais (Y_{exp}) e calculados (Y_{calc}) de AB_{TC} e valores de resíduo ($Y_{exp} - Y_{calc}$) obtidos a partir da equação 7.16 e também o gráfico de dispersão Y_{exp} (Y_{obs}) versus Y_{calc} .

a: resíduo: diferença em módulo entre o valor experimental e o calculado de AB.

Os descritores selecionados no modelo de QSAR representam propriedades hidrofóbicas, eletrônicas e estereoquímicas (descritores de natureza distinta) e não apresentaram intercorrelação, (valores de $r < 0,6$), sendo o maior valor de r encontrado para μ versus $ASA_h = 0,49$. O modelo obtido apresentou coeficiente de determinação múltipla $R^2 = 0,90$, o que sugere que a equação 7.16 explica 90% da variação dos dados e o valor do coeficiente de validação cruzada LOO, $Q^2 = 0,77$. O método de validação cruzada

LNO foi aplicado com os três descritores obtidos da MLR (figura 7.10). A retirada de até 5 moléculas ($N_{\text{crítico}} = 5$), que representa 28% do número total de amostras, não levou a uma variação considerável nos resultados estatísticos. Modelos são considerados robustos quando os valores do coeficiente de Q^2_{LNO} de cada corrida ($N = 1, 2, 3, \dots n$, com N igual a 20% a 30% do conjunto de amostras) são $> 0,5$ e os valores de desvios-padrão de cada Q^2_{LNO} em relação ao Q^2_{L00} médio permanecem na faixa de $\pm 0,05$ [60].

Figura 7.10 – Valores obtidos no processo de validação cruzada LNO.

[Processo realizado com o programa QSARmodeling¹⁰ e foram utilizados 3 repetições para cada validação cruzada. Valores de Q^2_{LNO} médio para cada corrida ($N = 1, 2, 3, \dots 9$) e respectivos valores de desvio-padrão (DP): $N=1$: $Q^2_{\text{L00}} = 0,766$, DP = 0,00; $N=2$: $Q^2_{\text{L20}} = 0,767$, DP = 0,01; $N=3$: $Q^2_{\text{L30}} = 0,777$, DP = 0,02; $N=4$: $Q^2_{\text{L40}} = 0,779$, DP = 0,01; $N=5$: $Q^2_{\text{L50}} = 0,766$, DP = 0,03; $N=6$: $Q^2_{\text{L60}} = 0,826$, DP = 0,11; $N=7$: $Q^2_{\text{L70}} = 0,807$, DP = 0,03; $N=8$: $Q^2_{\text{L80}} = 0,677$, DP = 0,12; $N=9$: $Q^2_{\text{L90}} = 0,516$, DP = 0,14.]

¹⁰ Programa QSARmodeling; desenvolvido e gentilmente disponibilizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Quimiometria Teórica e Aplicada – UNICAMP, sob coordenação da Profa. Dra. Márcia Miguel Castro Ferreira.

Ainda em relação aos parâmetros estatísticos, a equação 7.16 apresentou um baixo valor de desvio-padrão, $s = 0,11$ e alto valor no teste de Fischer, $F = 42,14$, o que representa 95% de significância.

Dessa forma, a equação 7.16 atende às necessidades para ser considerada um bom modelo de QSAR para os compostos investigados, desde a seleção das variáveis independentes e da qualidade do modelo avaliado por meio da análise dos parâmetros estatísticos até as informações obtidas dos descritores selecionados, os quais são informativos e consistentes com processos físico-químicos e biológicos envolvidos no desencadeamento da resposta biológica.

7.6.3 Estudos de QSAR-3D

A aplicação do programa VolSurf foi realizada para as duas atividades biológicas investigadas. O campo de força GRID foi aplicado para calcular os MIFs, e em seguida, as informações geradas foram convertidas nos descritores 2D. Estes descritores 2D foram quantitativamente correlacionados com os dados de atividade em *S. aureus* e *T. cruzi* usando o método de regressão PLS. Entretanto, em relação à atividade em *S. aureus*, o mesmo comportamento observado nos estudos de QSAR-2D foi novamente obtido nas regressões PLS, e não foram obtidos modelos estatisticamente aceitáveis, e assim, os estudos de QSAR-3D não foram realizados para esta atividade biológica.

Para a atividade frente a *T. cruzi*, o modelo que apresentou melhores resultados estatísticos para a série contendo 18 compostos foi obtido com a utilização das quatro sondas em conjunto. Após a aplicação da análise de FFD (taxa de combinação = 5; com retenção de variáveis incertas, % de dummies = 20) a fim de retirar as variáveis com menor contribuição e também evitar o problema de redundância, o número de descritores foi reduzido de 110 para 29 e apresentou uma ótima variância explicada ($R^2 = 0,98$) e um ótimo coeficiente de validação interna ($Q^2 = 0,93$), considerando três variáveis latentes e SDEP = 0,08. Os dados obtidos estão apresentados na tabela 7.6.

Tabela 7.6 – Índices estatísticos obtidos com o método PLS após a seleção de variáveis independentes (18 objetos; 29 variáveis (X); 1 atividade biológica (Y))

<i>VL</i>	<i>X_{VarExp}</i>	<i>X_{Accum}</i>	<i>SDEC</i>	<i>R</i> ²	<i>Q</i> ² (<i>LOO</i>)	<i>SDEP</i> (<i>LOO</i>)	<i>Q</i> ² (<i>LTO</i>)	<i>SDEP</i> (<i>LTO</i>)
0	0,000	0,000	0,308	0,000	-0,121	0,326	-0,125	0,326
1	37,199	37,199	0,164	0,715	0,436	0,230	0,402	0,237
2	17,391	54,591	0,052	0,970	0,902	0,096	0,823	0,129
3	7,441	62,031	0,042	0,981	0,932	0,080	0,928	0,084
4	12,164	74,195	0,041	0,982	0,865	0,113	0,870	0,111
5	8,311	82,506	0,039	0,984	0,831	0,126	0,835	0,124

VL = número de variáveis latentes; *X_{VarExp}* = variância total explicada; *X_{accum}* = Variância acumulada; SDEC = média da somatória dos resíduos; *R*² = coeficiente de determinação sem validação cruzada; *Q*² = coeficiente de predição obtido após validação cruzada (*LOO* = *leave-one-out*; *LTO* = *leave-two-out*); SDEP = desvio-padrão do erro de predição.

Na figura 7.11 estão ilustrados os gráficos com os parâmetros estatísticos *R*²/*Q*² (figura 7.11A) e SDEC/SDEP (figura 7.11B) *versus* o número de variáveis latentes necessárias para descrever o modelo. O aumento do número de VLs promove discreta melhora no coeficiente de determinação múltipla (*R*²) a partir de duas VLs, entretanto, evidencia-se que três VLs mostraram-se adequadas para descrever a atividade biológica, onde são observados o maior valor do coeficiente de validação interna (*Q*² = 0,93) e o menor valor de desvio-padrão do erro de predição (SDEP = 0,08).

O método de validação cruzada LNO foi aplicado com os 29 descritores e três VLs (figura 7.12). A retirada de 7 moléculas (*N_{crítico}* = 7), que representa em torno de 39% do número total de amostras, não levou a uma variação considerável nos resultados estatísticos.

Figura 7.11 – Parâmetros estatísticos *versus* número de componentes principais ou variáveis latentes do modelo. (A) Valores de R^2/Q^2 *versus* número de PCs do modelo. (B) Valores de SDEC/SDEP (LOO) *versus* número de PCs do modelo.

Figura 7.12 – Valores obtidos no processo de validação cruzada LNO.

[Processo realizado com o programa QSARmodeling e foram utilizados 3 repetições para cada validação cruzada. Valores de Q^2_{LNO} médio para cada corrida ($N = 1, 2, 3, \dots, 9$) e respectivos valores de desvio-padrão (DP): $N=1$: $Q^2_{L00} = 0,933$, DP = 0,00; $N=2$: $Q^2_{L20} = 0,921$, DP = 0,01; $N=3$: $Q^2_{L30} = 0,932$, DP = 0,01; $N=4$: $Q^2_{L40} = 0,905$, DP = 0,02; $N=5$: $Q^2_{L50} = 0,930$, DP = 0,00; $N=6$: $Q^2_{L60} = 0,895$, DP = 0,05; $N=7$: $Q^2_{L70} = 0,893$, DP = 0,03; $N=8$: $Q^2_{L80} = 0,706$, DP = 0,16; $N=9$: $Q^2_{L90} = 0,607$, DP = 0,37.]

Na tabela 7.7 são apresentados os valores de atividade obtidos experimentalmente (Y_{exp}) e os valores calculados pelo modelo (Y_{calc}) com 3 VLs. Inserido nesta tabela está o gráfico de Y_{calc} versus Y_{exp} , que demonstra a qualidade do modelo.

Tabela 7.7 – Valores experimentais (Y_{exp}) e valores calculados (Y_{calc}) de AB_{TC} e os respectivos resíduos obtidos a partir do modelo com 3 PCs. O gráfico de Y_{exp} (Y_{obs}) versus Y_{calc} também está apresentado.

a: resíduo: diferença em módulo entre o valor experimental e o calculado de AB.

As duas primeiras VLs são responsáveis por explicar 54,6% da variabilidade dos dados originais. O gráfico de pesos para estas componentes (figura 7.13A) demonstra que a atividade biológica dos compostos (representada no gráfico por Y_1) correlaciona-se em maior intensidade com os descritores de regiões hidrofóbicas **D** e **BV**; com os descritores de regiões hidrofílicas **Iw** e com o **logP** localizados na região positiva da VL1. Enquanto que

para os descritores de interações de hidrogênio **HB**, regiões hidrofílicas **W** e fator de capacidade **Cw** a contribuição para a atividade biológica é negativa. A VL1 está relacionada com a atividade biológica, visto que discrimina dois grupos de compostos em regiões opostas, ilustrada no gráfico de escores (figura 7.13B). O primeiro deles contendo os compostos **7q** ($R_1 = I$), **7o** ($R_1 = Br$), **7g** ($R_1 = CH_2CH_3$), **7i** ($R_1 = Cl$), **7r** ($R_1 = Cl$, $R_2 = Cl$), **7s** ($R_1 = Cl$, $R_3 = Cl$) localizados à direita do gráfico de escores (escores positivos), são os compostos que apresentaram melhor atividade ($AB_{TC} \geq 5,0$), e um segundo grupo com os compostos **7p** ($R_1 = SO_2NH_2$) e **7p** ($R_1 = NH_2$) localizados à esquerda do gráfico (escores negativos) que se mostraram menos ativos ($AB_{TC} < 4,25$).

Figura 7.13 – (A) Gráfico de pesos e (B) de escores de VL1 versus VL2 para o modelo obtido com 3 VLS.

Os descritores VolSurf com maior impacto sobre a atividade anti-*T. cruzi* são apresentados no gráfico de coeficientes (figura 7.14), onde as barras representam a contribuição de cada descritor para o modelo. A atividade dos compostos é favorecida a partir de valores positivos de descritores de momentos de energia *integy* hidrofílicos (Iw2OH2, Iw3OH2, Iw7OH2); descritores de regiões hidrofóbicas (D1DRY, D3DRY); melhores volumes (BV21DRY e BV22DRY); volume (VOH2), superfície (SOH2) e

rugosidade molecular (ROH2) e elevado valor do coeficiente de partição (logP). Por outro lado, a região hidrofílica (W2OH2), fator de capacidade (Cw10H2, Cw20H2, Cw30H2), distância entre os melhores mínimos de energia local (D13OH2), melhores volumes (BV11OH2 e BV12OH2), regiões hidrofílicas (W2-6O) e ligações de hidrogênio (HB10, HB20 e HB60) da sonda oxigênio, e, as regiões hidrofílicas (W3N1 e W4N1) e ligações de hidrogênio (HB8ON1) da sonda amida, são inversamente relacionados com a atividade biológica alvo.

Figura 7.14 – Gráfico de coeficientes do modelo PLS para os descritores que são diretamente (valores positivos) ou inversamente (valores negativos) correlacionados com a atividade anti-*T. cruzi* dos compostos.

Em concordância com os estudos de QSAR-2D, os descritores obtidos no modelo de QSAR-3D, descrevem as propriedades estereoquímicas e hidrofóbicas como as mais importantes na atividade dos compostos.

Os descritores VOH2, SOH2 e ROH2, referentes ao volume, superfície e rugosidade molecular, respectivamente, são relacionados à forma e ao tamanho dos compostos e valores positivos destes descritores contribuem favoravelmente para a AB_{TC}.

Os valores positivos de descritores de momentos *integy* hidrofílicos (Iw2OH2, Iw3OH2, Iw7OH2) indicam que as regiões hidrofílicas estão concentradas em uma determinada área da superfície molecular nos compostos mais ativos e os valores negativos dos fatores de capacidade (Cw1OH2, Cw2OH2, Cw3OH2) indicam que estas regiões não estão difundidas sobre a superfície molecular. Uma vez que a série é congênere, as diferenças nas regiões hidrofílicas são atribuídas as características dos grupos substituintes ligados ao anel benzênico, ou seja, a inclusão de grupos hidrofílicos tende a aumentar os valores do fator de capacidade (devido ao acréscimo nas regiões hidrofílicas sobre a superfície molecular), e, com isso, os valores de momentos *integy* hidrofílicos decaem, por serem vetores que apontam do centro da massa para o centro das regiões hidrofílicas. O mesmo pode ser observado para os descritores de regiões hidrofóbicas (D1DRY e D3DRY) que estão relacionados à distribuição de regiões hidrofóbicas e melhores volumes (BV21DRY e BV22DRY) que indicam os maiores volumes de regiões hidrofóbicas nas estruturas moleculares. Aliado a estes descritores, tem a contribuição positiva de logP, cujo valor aumenta com a inclusão de grupos hidrofóbicos no anel aromático.

Para exemplificar a influência dos descritores VolSurf sobre a atividade biológica, uma análise comparativa entre o composto mais ativo **7q** (R₁ = I; AB_{TC} = 5,21) e o menos ativo **7c** (R₁ = NH₂; AB_{TC} = 3,93) é ilustrada na figura 7.15. Os altos valores dos descritores volume molecular (VOH2), superfície molecular (SOH2), rugosidade (ROH2), momentos *integy* hidrofílicos (Iw2DRY e Iw3DRY), regiões hidrofóbicas (D1DRY e D3DRY), melhores volumes (BV21OH2 e BV22OH2) e logP explicam a potência elevada do composto mais ativo **7q** (figura 7.15A), enquanto que o composto **7c** exibe valores negativos ou quase nulos para estes descritores (figura 7.15B).

Figura 7.15 – Representação da contribuição dos descritores na atividade anti-*T. cruzi* dos compostos **7q** (A) e **7c** (B) (à direita). MIFs dos respectivos compostos calculados no campo GRID com sonda OH2 (à esquerda).

[As regiões mostradas em ciano são as regiões hidrofílicas com contorno em -3,0 kcal/mol. As setas vermelhas representam os momentos *integy* hidrofílicos calculados em oito diferentes níveis de energia. as moléculas são exibidas no modelo tubo (átomos de carbono em cinza, oxigênios em vermelho, nitrogênios em azul, iodo em roxo e os átomos de hidrogênio são apresentados em branco). **7c**: 4-amino[*N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida; composto **7q**: 4-iodo[*N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno] benzidrazida]

7.7 Conclusões

Com o objetivo principal de entender as propriedades físico-químicas e estruturais que influenciam a atividade frente a *S. aureus* e frente a *T. cruzi* dos derivados benzofuroxânicos planejados e sintetizados neste estudo, estudos de QSAR-2D e 3D foram realizados. Devido à pequena variação na distribuição dos valores de atividade antibacteriana obtidos para os compostos, não foi possível estabelecer um modelo matemático de qualidade com a aplicação dos métodos de regressão MLR e PLS.

Quanto à atividade anti-*T. cruzi*, o modelo gerado sugere que as variáveis independentes mais importantes para os compostos investigados são a hidrofobicidade (π), o momento de dipolo (μ) e a superfície de acessibilidade ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos (ASA_h). A correlação linear positiva com os descritores π e ASA_h indicam que a atividade pode ser melhorada com o aumento da hidrofobicidade dos grupos substituintes/compostos. A correlação linear negativa com o descritor μ sugere que a atividade diminui a medida que a polaridade dos compostos aumenta. Os estudos de QSAR-3D corroboraram a análise de Hansch, uma vez que os resultados demonstraram que a atividade dos compostos é influenciada pelas características hidrofóbicas bem como a forma e tamanho dos grupos substituintes/compostos.

A partir das relações obtidas é possível compreender as propriedades que influenciam a atividade anti-*T. cruzi* dos compostos, auxiliando assim, no desenvolvimento de novos compostos com atividade incrementada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] JHANWAR, B., SHARMA, V., SINGLA, R.K., SHRIVASTAVA, B. QSAR - Hansch analysis and related approaches in drug design. *Pharmacologyonline*. 1, 306 – 344, **2011**.
- [2] VERMA, J., KHEDKAR, V.M., COUTINHO, E. C. 3D - QSAR in drug design - a review. *Curr Top Med Chem* . 10, 95-115, **2010**.

- [3] WATERBEEMND, H.V., ROSE, S. Quantitative approaches to structure-activity relationships. In: WERMUTH, C.G., ed. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3.ed. Oxford:Elsevier, **2008**. p. 491 – 513.
- [4] HANSCH, C., FUJITA, T. ρ - σ - π analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J Am Chem Soc.* 86, 1616 – 1626, **1964**.
- [5] KUBINYI, H. QSAR: Hansch analysis and related approaches. New York:VCR, **1993**.
- [6] SELASIE, S.D. History of quantitative structure-activity relationships. In: ABRAHAM, D.J., ed. *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Volume 1, Drug Discovery*. 6.ed. New York: Willey-Interscience, **2003**. p. 1 – 49.
- [7] HANSCH, C. Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. *Acc Chem Res.* 2, 232 – 239, **1969**.
- [8] TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. *Quím. Nova.* 27, 631 – 639, **2004**.
- [9] KUBINYI, H. Quantitative Structure-Activity Relationships. 7. The Bilinear Model, a new model for nonlinear dependence of biological activity on hydrophobic character. *J Med Chem.* 20, 625 – 629, **1977**.
- [10] FURLANETTO, M., TAVARES, L.C. Validação de $\frac{1}{2}C=O$ como descritor estrutural de caráter eletrônico para aplicação em estudos de QSAR/QSPR. *Rev Bras Cienc Farm.* 39, 449-456, **2003**.
- [11] HANSCH, C., LEO, A., Exploring QSAR: fundamentals and applications in chemistry and biology. Washington:American Chemical Society, **1995**.
- [12] VERLOOP, A. The STERIMOL approach to drug design. Marcel Dekker:New York, **1987**.
- [13] MONTANARI, M.L.C., MONTANARI, C.A. Validação lateral em relações quantitativas entre estrutura e atividade farmacológica, QSAR. *Quim Nova.* 2, 231-240, **2002**.
- [14] TESTA, B., CRIVORI, P., REISRT, M., CARRUPT, P.A. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behaviour of drugs. Concepts and examples. *Perspect Drug Discov.* 19, 179-211, **2000**.
- [15] GUYTON, A.C., HALL, J.E. Tratado de fisiologia médica. 9.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, **1997**.
- [16] BARREIRO, E.J., FRAGA, C.A.M. Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, **2008**.

- [17] MANNHOLD, R., OSTERMANN, C. Prediction of logP with substructure-based methods, In: MANNHOLD, R., KUBINYI, H., FOLKERS, G., eds. *Molecular Drug Properties-Measurement and Prediction*. Wiley-VCH:Verlag GmbH & Co. KGaA, **2008**. P. 357-379.
- [18] GIURATO, L., GUCCIONE, S. Comparing log *p* calculations by the Ghose–Crippen and Villar methods. In: MONGE, A., C. GANELLIN, C.R. eds. *Practical Studies for Medicinal Chemistry*. IUPAC. **2006**. Disponível em < http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/>. Acesso em: 08 Ago 2010.
- [19] GRAMATICA, P. A short history of QSAR evolution [Online]. Disponível em: <http://www.qsarworld.com/temp_fileupload/shorthistoryofqsar.pdf/>. Acesso em: 22 ago 2011.
- [20] UNGER, S.H., HANSCH, C. On model building in structure-activity relationships. A reexamination of adrenergic blocking activity of beta-halo-beta-arylalkylamines. *J Med Chem*. 16, 745 – 749, **1973**.
- [21] GAUDIO, A.C., ZANDONADE, E.Z. proposição, validação e análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica. *Quim Nova*. 24, 658 – 671, **2001**.
- [22] HANSCH, C., VERMA, R.P. Larvicidal activities of some organotin compounds on mosquito larvae: A QSAR study. *Eur J Med Chem*. 44, 260 – 273, **2009**.
- [23] PERKINS, R, FANG, H., TONG, W., WELSH, W.J. Quantitative structure–activity relationship methods:perspectives on drug discovery and toxicology. *Environ Toxicol Chem*. 22, 1667 – 1679, **2003**.
- [24] DUDEK, A.Z., ARODZ, T., GÁLVEZ, J. Computational methods in developing quantitative structure-activity relationships (QSAR): a review. *Comb Chem High Throughput Screen*. 9, 213 – 228, **2006**.
- [25] GÜNER, O.F. History and evolution of the pharmacophore concept in computer-aided Drug Design. *Curr Top Med Chem*. 2, 1321 – 1332, **2002**.
- [26] LANGER, T., BRYANT, S.D. *3D Quantitative structure-property relationships*. In: WERMUTH, C.G., ed. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 3.ed. Oxford:Elsevier, **2008**. p. 587 – 604.
- [27] CRUCIANI, G., CRIVORI, P., CARRUPT, P.-A., TESTA, B. Molecular Fields in Quantitative Structure-Permeation Relationships: The VolSurf Approach. *J Mol Struct: THEOCHEM*. 503, 17 – 30, **2000**.
- [28] CRUCIANI, G., PASTOR, M., CLEMENTI, S. Handling information from 3D grid maps for QSAR studies. In: Gundertofte, K., Jorgensen, F.E., eds. *Molecular modeling and prediction of bioactivity*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2000. p. 73 – 82.

[29] CRIVORI, P., CRUCIANI, G., CARRUPT, P. A., TESTA, B. Predicting blood-brain barrier permeation from three-dimensional molecular structure. *J Med Chem.* 43, 2204 – 2216, **2000**.

[30] VOLSURF 7.2 (**2006**) Molecular Discovery, LD, Disponível em: <<http://www.moldiscovery.com/>>. Acesso em: 17 ago 2011.

[31] FORTUNA, C.G., BARRESI, V., BERELLINIB, G., MUSUMARRA, G. Design and synthesis of trans 2-(furan-2-yl)vinylheteroaromatic iodides with antitumour activity. *Bioorg Med Chem.* 16, 4150 – 4159, **2008**.

[32] FERREIRA, M.M.C. Multivariate QSAR. *J Braz Chem Soc.* 13, 742 – 753, **2002**.

[33] MOITA NETO, J.M., MOITA, G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Quím Nova.* 21, 467 – 469, **1998**.

[34] FERREIRA, M.M.C., MONTANARI, C.A., GAUDIO, A.C. Seleção de variáveis em QSAR. *Quím Nova.* 25, 439 – 448, **2002**.

[35] FERREIRA, M.M.C. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a QSPR study. *Chemosphere.* 44, 125 – 146, **2001**.

[36] PNIEWSKA, B., JANUCHOWSKI, M. Structural investigations of nifuroxazide, *p*-hydroxy-N'-(5-nitrofurfurylidene)benzhydrazide. *Pol J Chem.* 72, 2629 – 2634, **1998**.

[37] NG, W.S. Low-temperature redetermination of benzofurazan 1-oxide. *Acta Cryst.* E65, o1275, **2009**.

[38] ALLINGER, N.L. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J Am Chem Soc.* 99, 8127 – 8134, **1977**.

[39] DEWAR, M.J.S.E., ZOEBISCH, G., HEALY, E.F., STEWART, J.J.P. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. *J Am Chem Soc.* 107, 3902 – 3909, **1985**.

[40] BRENNEMAN, C.M., WIBERG, K.B. Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. *J Comp Chem.* 11, 361 – 373, **1990**.

[41] HANSCH, C., LEO, A., UNGER, S.H., KIM, K.H., NIKAITANI, D., LIEN, E.J. Aromatic substituent constants for structure-activity correlations. *J Med Chem.* 16, 1207–1216, **1973**.

[42] NORRINGTON, F.E., HYDE, R.M., WILLIAMS, S.G., WOOTTON, R. Physiochemical-activity relations in practice. 1. A rational and self-consistent data bank. *J Med Chem.* 18, 604–607, **1975**.

- [43] OLIVEIRA, D.B., GAUDIO, A.C. BuildQSAR: A new computer program for QSAR analysis. *Quant Struct-Act Relat.* 19, 599 – 601. **2000.**
- [44] RANDO, D.G., GIAROLLA, J., PASQUALOTO, K.F.M., FERREIRA, E.I. Chalcones and N-acylhydrazones: direct analogues? Exploratory data analysis applied to potential novel antileishmanial agents. *Braz J Pharm Sci*, 46, 311 – 321, **2010.**
- [45] AGUIRRE, G., BOIANI, M., CABRERA, E., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., DENICOLA, A., SANT'ANNA, C.M., BARREIRO, E.J. New potent 5-nitrofuryl derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. 3D-QSAR (CoMFA) studies. *Eur J Med Chem.* 41, 457 – 466, **2006.**
- [46] HUMPHREY, W., DALKE, A., SCHULTEN, K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Molec Graphics.* 14, 33 – 38, **1996.**
- [47] DOHERTY, D. *MOLSIM*: Molecular mechanics and dynamics simulation software - User's Guide, version 3.2. Lake Forest: The Chem21 Group Inc., 1997.
- [48] GUADAGNINI, P.H., BRUNS, R.E., SOUZA, A.A. Cargas atômicas em moléculas. *Quim Nova.* 19, 148 – 155, **1996.**
- [49] HOLTJE, H.D. Molecular modeling: basic principles and applications. New York: VCH, **1996.**
- [50] CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., RISSO, M., SAENZ, P., SEOANE, G., DENICOLA, A., PELUFFO, G., QUIJANO, C., OLEA-AZAR, C. 1,2,5-Oxadiazole N-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs. structure-activity relationships. *J Med Chem.* 42, 1941 – 1950, **1999.**
- [51] AGUIRRE, G., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., PORCAL, W., SEOANE, G., DENICOLA, A., ORTEGA, M. A., ALDANA, I., MOGE-VEGA, A. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. structure-activity relationships. Part II. *Arch. Pharm.* 335, 15 – 21, **2002.**
- [52] AGUIRRE, G., BOIANI, L., BOIANI, M., CERECETTO, H., DI MAIO, R., GONZÁLEZ, M., PORCAL, W., DENICOLA, A., PIRO, O., CASTELLANO, E., SANT'ANNA, C. M. R., BARREIRO, E. J. New potent 5-substituted benzofuroxans as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth. quantitative structure-activity relationship studies. *Bioorg Med Chem.* 13, 6336 – 6346, **2005.**
- [53] GERPE, A., AGUIRRE, G., BOIANI, L., CERECETTO, H., GONZÁLEZ, M., OLEA-AZAR, C., RIGOL, C., MAYA, J. D., MORELLO, A., PIRO, O., ARÁN, V. J., AZQUETA, A., LOPEZ DE CERAIN, A., MOGE-VEGA, A., ROJAS DE ARIAS, A., YALUFF, G. Indazole N-oxide derivatives as antiprotozoal agents: Synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies. *Bioorg Med Chem.* 14, 3467 – 3480, **2006.**

- [54] ARROIO, A., HONORIO, K.M., SILVA, A.B.F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Quim Nova*. 33, 694 – 699, **2010**.
- [55] BOIANI, M., CERECETTO, H., GONZALEZ, M., GASTEIGER, J. Modeling anti-*Trypanosoma cruzi* activity of N-oxide containing heterocycles. *J Chem Inf Model*. 48, 213 – 219. **2008**.
- [56] TRIPOS BOOKSHELF 8.0, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- [57] MARVIN, version 5.0.4.1, **2010**, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).
- [58] 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*. 1, 216–228, **2010**.
- [59] GEA, S., GUIÑAZU, N., PELLEGRINI, A., CARRERA SILVA, E.A., GIORDANENGO, L., CANO, R., AOKI, M.P. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* cystein protease in the host-parasite interplay. *Inmunología*. 4, 225 – 238, **2006**.
- [60] KIRALJ, R., FERREIRA, M.M.C. Basic validation procedures for regression models in qsar and qspr studies:theory and application. *J Braz Chem Soc*. 770 – 787, **2009**.

8

Conclusões

Foi desenvolvida neste estudo uma série de derivados benzofuroxânicos, análogos funcionais da nifuroxazida, com vista a identificar moléculas com potencial de serem utilizadas no desenvolvimento de um novo fármaco com atividade biológica frente a *Staphylococcus aureus* e, também, frente a *Trypanosoma cruzi*. Os seguintes apontamentos foram obtidos durante o decorrer deste estudo:

- 1) Vinte *R*-[*N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazidas, mono ($R_1 = 4\text{-H}, 4\text{-CH}_3, 4\text{-NH}_2, 4\text{-F}, 4\text{-CN}, 4\text{-CH}_2\text{CH}_3, 4\text{-OCH}_3, 4\text{-Cl}, 4\text{-COCH}_3, 4\text{-OCH}_2\text{CH}_3, 4\text{-NO}_2, 4\text{-CF}_3, 4\text{-Br}, 4\text{-SO}_2\text{NH}_2$ e 4-I) e dissubstituídas ($R_1 = 4\text{-Cl}$ e $R_3 = 2\text{-Cl}$; $R_1 = 4\text{-Cl}$ e $R_2 = 3\text{-Cl}$; $R_1 = 4\text{-NO}_2$ e $R_2 = 3\text{-CF}_3$) foram sintetizadas e caracterizadas por meio de análises espectrométricas de RMN ^1H e ^{13}C . O grau de pureza destes compostos foi avaliado por análise centesimal CHN e variação da faixa de fusão. Ressalta-se que os vinte compostos obtidos apresentam estrutura química inédita, e também, foram sintetizados e identificados dois compostos intermediários não descritos em literatura:

4-nitro-3-trifluorobenzoato de metila e *4-nitro-3-trifluorobenzidrazida*.

- 2) A síntese dos reagentes necessários para a obtenção dos vinte derivados benzofuroxânicos foi explorada e diferentes abordagens sintéticas foram utilizadas. A obtenção de benzidrazidas, assim como do aldeído, em etapa sintética única mostrou-se método rápido e com melhorias no rendimento. Estas

otimizações refletiram de maneira positiva no rendimento global dos compostos finais, onde obteve-se ganho real de 69% de produto final em relação aos métodos sintéticos tradicionais.

- 3) Os vinte compostos foram avaliados frente as cepas padrão e multirresistentes (3SP/R33-MRSA e VISA3) de *S. aureus*, e observou-se o mesmo perfil de atividade para as três cepas, onde o composto **7t** ($R_1 = 4\text{-NO}_2$, $R_2 = 3\text{-CF}_3$) apresentou melhor atividade considerando a concentração inibitória mínima como *endpoint* biológico (CIM: 12,7 – 11,4 $\mu\text{g/mL}$).
- 4) O método de microdiluição padronizado e adotado neste estudo mostrou-se de rápida execução, econômico do ponto de vista de consumo de materiais e, principalmente reprodutível, entretanto, para os compostos **7g** ($R_1=4\text{-CH}_2\text{CH}_3$), **7k** ($R_1=4\text{-N(CH}_3)_2$), **7l** ($R_1 = 4\text{-OCH}_2\text{CH}_3$) e **7k** ($R_1 = 4\text{-SO}_2\text{NH}_2$) os resultados obtidos mostraram-se inconclusivos, visto que não foi possível determinar a atividade dos mesmos, sendo necessário, desta forma, adaptar o método para testar compostos com baixa solubilidade nos meio de cultura a partir da modificação do solvente utilizado no preparo das soluções-mãe.
- 5) Os vinte compostos foram avaliados também frente a formas epimastigotas de cepas Y de *T. cruzi*. O composto **7n** ($R_1 = 4\text{-CF}_3$) apresentou melhor perfil de atividade nos ensaios realizados na fase logarítmica de crescimento parasitário, onde foi observado inibição de 86% do número de parasitas quando utilizado 10 $\mu\text{g/mL}$ de composto. Na fase estacionária do crescimento parasitário, avaliou-se a concentração de composto necessária para inibir 50% das formas epimastigotas e identificou-se o composto **7q** ($R_1 = 4\text{-I}$) como o mais ativo, $\%IC_{50} = 5,21 \mu\text{M}$ ($\cong 2,50 \mu\text{g/mL}$).
- 6) O método espectrofotométrico padronizado e adotado neste estudo para avaliar a concentração de parasitas nos meios de cultura, também mostrou-se de rápida execução, econômico do ponto de vista de consumo de materiais, reprodutível e

seguro, visto que apenas materiais descartáveis foram utilizados quando do manuseio das soluções contendo os parasitas.

- 7) A modificação estrutural proposta para o grupo farmacofórico demonstrou ser alternativa viável no desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, visto que a inserção do sistema benzofuroxano, considerando sua semelhança com o grupo nitro presente na nifuroxazida, resultou em compostos ativos tanto para *S. aureus* quanto para *T. cruzi*. Entretanto, é prematuro afirmar que a bioatividade dos derivados benzofuroxânicos investigados seja a partir da redução enzimática do grupamento *N*-óxido, sendo estritamente necessário estudos complementares para corroborar este mecanismo de ação.
- 8) O planejamento do conjunto de compostos, onde a escolha dos grupos substituintes considerando as características eletrônicas e hidrofóbicas foi baseada no diagrama de Craig, mostrou-se exequível, uma vez que os estudos de QSAR-2D demonstraram a influência destas duas propriedades na atividade anti-*T. cruzi*.
- 9) Os estudos de modelagem molecular dos compostos envolvendo métodos de dinâmica molecular, otimização de geometria, análise de mapas de potencial eletrostático e lipofílico permitiram a definição de propriedades estruturais e eletrônicas pertinentes no estabelecimento dos modelos de QSAR.
- 10) A influência das propriedades físico-químicas e estruturais em ambas atividades dos compostos foi observada, entretanto para *S. aureus* não foi possível obter modelos de QSAR-2D/3D para identificar quais propriedades são mais relevantes, fato atribuído à pequena variação de atividade entre o composto mais ativo **7t** ($R_1=4\text{-NO}_2$, $R_2=3\text{-CF}_3$) e o menos ativo **7d** ($R_1 = 4\text{-OH}$) que variou de 4,59 – 4,01 quando considerada a atividade em valor de potência ($\log 1/C$).

- 11) A hidrofobicidade dos grupos substituintes mostrou ser a propriedade que mais influencia e, de maneira positiva, a atividade anti-*T. cruzi*.
- 12) Estudos de QSAR-2D, por aplicação da Análise de Hansch, definiu um modelo linear que estabelece que a atividade anti-*T. cruzi* dos derivados benzofuroxânicos é favorecida pela constante de hidrofobicidade π de Hansch e pela propriedade estereoquímica superfície acessível ao solvente de todos os átomos hidrofóbicos (ASA_h), enquanto que propriedade eletrônica momento de dipolo elétrico (μ) tem contribuição inversa. Todas estas propriedades condizem com estudos descritos em literatura quando da investigação da atividade anti-*T. cruzi* envolvendo compostos com sistema benzofuroxano como grupo farmacofórico. O modelo de QSAR-2D obtido com estas três variáveis independentes apresentou parâmetros estatísticos aceitáveis, $R^2 = 0,90$ e $Q^2_{LOO} = 0,77$.
- 13) Estudos de QSAR-3D, por aplicação do programa VolSurf, confirmaram a análise de Hansch, uma vez que os resultados demonstraram que a atividade dos compostos é influenciada pelas características hidrofóbicas bem como pela forma e tamanho dos grupos substituintes/compostos. O modelo de QSAR-3D obtido com três variáveis latentes apresentou ótimos parâmetros estatísticos, $R^2 = 0,98$ e $Q^2_{LOO} = 0,93$.

Desta forma, os resultados obtidos forneceram informações relevantes acerca das propriedades físico-químicas e estruturais que influenciam a atividade biológica dos compostos investigados, e, estas informações aliadas às metodologias desenvolvidas neste estudo, tanto sintéticas como de determinação de *endpoints* biológicos, podem ajudar diretamente no processo de otimização da atividade biológica frente a *S. aureus* e frente a *T. cruzi* de compostos *R*-[*N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazidas.

Com o aporte de estudos complementares, pode-se então, em um futuro próximo, multiplicar as chances de selecionar possíveis candidatos a fármacos, contribuindo assim com novas opções terapêuticas em infecções causadas por estes microrganismos.

Anexo 1

Espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C dos compostos sintetizados

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 10,09 (s, 1H, C=O), 8,43 (s, 1H, H4), 7,85 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H7), 7,78 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H6).

Espectro de RMN ^1H do intermediário 5-formilbenzofuroxano.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 191,1 (C=O), 153,2 (C5), 136,8 (C7a), 129,6
 (C3a), 122,1 (C7), 119,2 (C4), 114,8 (C6).

Espectro de RMN ^{13}C do intermediário 5-formilbenzofuroxano.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,94 (s, 1H, H10), 8,49 (s, 1H, H8), 7,91 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H6), 7,90 (d, 2H, $J = 6,9$ Hz, H13,H17), 7,80 (s, 1H, H4), 7,68 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H7), 7,61 – 7,57 (m, 1H, H15), 7,56 – 7,48 (m, 2H, H14,H16).

Espectro de RMN ^1H da *N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 163,8 (C11), 144,2 (C8), 137,3 (C5), 132,9
 (C12), 131,7 (C7a), 131,3 (C15), 131,0 (C3a),
 128,6 (C6), 127,9 (C14,C16), 127,5 (C13,C17),
 115,7 (C7), 114,2 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C da *N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H da 4-metil[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75MHz):
 δ (ppm): 164,4 (C11), 144,8 (C8), 142,3 (C15),
 138,2 (C5), 131,2 (C12); 130,8 (C7a), 129,5
 (C3a), 129,3 (C14,C16), 129,0 (C6), 128,4
 (C13,C17), 116,5 (C7), 114,9 (C4), 21,3 (CH $_3$).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-metil[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz,): δ (ppm): 11,59 (s, 1H, H10), 8,48 (s, 1H, H8), 7,96 (d, 1H, J = 9,5 Hz, H6), 7,76 (s, 1H, H4), 7,71 (d, 1H, J = 9,5 Hz, H7), 7,70 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H13,H17), 6,64 (d, 2H, J = 8,6 Hz, H14,H16), 5,61 (s, 2H, NH_2).

Espectro de RMN ^1H da 4-amino[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75MHz): δ (ppm):
 163,5 (C11), 158,9 (C15), 152,0 (C8), 142,6
 (C5), 137,7 (C6), 129,3 (C13,C17), 128,8
 (C7a), 128,4 (C3a), 119,2 (C12), 115,5 (C7),
 113,3 (C4), 112,5 (C14,C16).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-amino[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ (ppm): 11,73 (s, 1H, H10), 9,96 (s, 1H, OH), 8,50 (s, 1H, H8), 7,95 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H6), 7,84 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H13, H17), 7,80 (s, 1H, H4), 7,72 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H7), 6,89 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H14, H16).

Espectro de RMN ^1H da 4-hidroxi[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75MHz): δ (ppm):
 163,5 (C11), 161,4 (C15), 144,4 (C8), 136,9
 (C5), 131,1 (C6), 130,4 (C13,C17), 129,9
 (C7a), 127,6 (C3a), 123,8 (C12), 118,3 (C7),
 115,5 (C14,C16), 113,4 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-hidroxi[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,95 (s, 1H, H10), 8,47 (s, 1H, H8), 7,98 (d, 2H, $J = 7,0$ Hz, H13, H17), 7,91 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H6), 7,81 (s, 1H, H4), 7,69 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H7), 7,32 (d, 2H, $J = 7,9$ Hz, H14, H16).

Espectro de RMN ^1H da 4-fluoro[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C da 4-fluoro[*N'*-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ (ppm): 12,12 (s, 1H, H10), 8,48 (s, 1H, H8), 8,04 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H13,H17), 7,96 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H14,H16), 7,83 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H6), 7,79 (s, 1H, H4), 7,70 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H7).

Espectro de RMN ^1H da 4-ciano[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz):
 δ (ppm): 159,8 (C11), 145,4 (C8), 136,8 (C12),
 132,8 (C5), 129,6 (C14,C16), 129,3 (C7a), 129,0
 (C3a), 128,6 (C13,C17), 127,7 (C6), 118,1 (CN),
 117,1 (C15), 116,7 (C7), 115,2 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-ciano[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H da 4-etil[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75MHz): δ (ppm):
 164,5 (C11), 148,5 (C8), 144,8 (C15), 138,2 (C5), 132,5 (C12), 131,1 (C7a), 129,5 (C3a), 128,4 (C14,C16), 128,3 (C6), 128,1 (C13,C17), 116,5 (C7), 114,9 (C4), 28,5 (CH_2), 15,3 (CH_3).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-etil[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,80 (s, 1H, H10), 8,48 (s, 1H, H8), 7,92 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H6), 7,90 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, H13,H17), 7,79 (s, 1H, H4), 7,70 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H7), 7,04 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H14,H16), 3,84 (s, 3H, CH_3).

Espectro de RMN ^1H 4-metóxi[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75MHz): δ (ppm):
 164,0 (C15), 162,7 (C11), 144,5 (C8), 138,2 (C5), 130,7 (C7a), 130,3 (C13,C17), 130,1 (C3a), 129,5 (C6), 125,8 (C12), 116,5 (C7), 114,7 (C4), 114,1 (C14,C16), 55,9 (CH₃).

Espectro de RMN ^{13}C 4-metóxi[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,97 (s, 1H, H10), 8,45 (s, 1H, H8), 7,91 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H13,H17), 7,87 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H6), 7,80 (s, 1H, H4), 7,68 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H7), 7,55 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H14,H16).

Espectro de RMN ^1H da 4-cloro[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75MHz): δ (ppm):
 159,8 (C11), 145,3 (C8), 137,9 (C15), 137,2 (C5), 132,4 (C12), 130,3 (C13,C17), 130,2 (C7a), 129,4 (C3a), 128,8 (C14,C16), 127,6 (C6), 116,6 (C7), 115,3 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-cloro[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,06 (s, 1H, H10), 8,49 (s, 1H, H8), 8,05 (d, 2H, J = 8,4 Hz, H13,H17), 8,00 (d, 2H, J = 8,3 Hz, H14,H16), 7,81 (s, 1H, H4), 7,74 (d, 1H, J = 9,6 Hz, H6), 7,68 (d, 1H, J = 9,5 Hz, H7), 2,61 (s, 3H, CH_3).

Espectro de RMN ^1H da 4-acetil[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^{13}C da 4-acetil[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ (ppm): 11,64 (s, 1H, H10), 8,48 (s, 1H, H8), 7,93 (d, 1H, $J = 9,6$ Hz, H6), 7,82 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H13, H17), 7,74 (s, 1H, H4), 7,69 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H7), 6,75 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H14, H16), 2,99 (s, 6H, N(CH $_3$) $_2$).

Espectro de RMN ^1H da 4-dimetilamino[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75MHz): δ (ppm):
 164,1 (C11), 153,2 (C15), 143,6 (C8), 138,5
 (C5), 129,9 (C13,C17), 129,6 (C7a), 127,9
 (C3a), 126,4 (C6), 119,8 (C12), 116,3 (C7),
 114,3 (C4), 111,3 (C14,C16), 41,2 (N(CH $_3$) $_2$).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-dimetilamino[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

Espectro de RMN ^1H da 4-etóxi[N' -(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm): 164,0 (C15), 162,0 (C11), 144,5 (C8), 138,2 (C5), 130,4 (C7a), 130,3 (C13,C17), 129,8 (C3a), 129,5 (C6), 125,6 (C12), 116,6 (C7), 114,8 (C4), 114,7 (C14,C16), 64,0 (CH_2), 14,9 (CH_3).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-etóxi[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz,):

δ (ppm): 12,22 (s, 1H, H10), 8,50 (s, 1H, H8), 8,35 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H14,H16), 8,14 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H13,H17), 7,95 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H6), 7,88 (s, 1H, H4), 7,72 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H7).

Espectro de RMN ^1H da 4-nitro[N' -(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 162,5 (C11), 149,5 (C15), 146,3 (C8), 139,4
 (C12), 137,7 (C5), 129,9 (C13,C17), 129,7
 (C7a), 129,6 (C3a), 129,4 (C6), 123,8
 (C14,C16), 116,7 (C7), 115,6 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-nitro[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,13 (s, 1H, H10), 8,49 (s, 1H, H8), 8,15 (d, 1H, $J = 9,5$ Hz, H6), 8,09 (d, 2H, $J = 7,7$ Hz, H13,H17), 7,87 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H14,16), 7,86 (s, 1H, H4), 7,71 (d, 1H, $J = 9,6$ Hz, H7).

Espectro de RMN ^1H da 4-trifluorometil[N' -(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 159,8 (C11), 145,9 (C8), 137,8 (C12), 137,5
 (C15), 135,4 (C5), 132,6 (C7a), 131,9 (C3a),
 129,2 (C13,C17), 126,1 (C6), 125,7 (C14,C16),
 122,5 (CF $_3$), 116,7 (C7), 115,5 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-trifluorometil[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ (ppm): 11,97 (s, 1H, H10), 8,46 (s, 1H, H8), 7,88 (d, 1H, $J = 9,1$ Hz, H6), 7,83 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, H13, H17), 7,81 (s, 1H, H4), 7,70 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H14, H17), 7,68 (d, 1H, $J = 9,1$ Hz, H7).

Espectro de RMN ^1H da 4-bromo[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz):
 δ (ppm): 159,8 (C11), 145,4 (C8), 138,0 (C5),
 132,9 (C12), 131,8 (C14,C16), 130,6 (C7a),
 130,4 (C13,C17), 129,9 (C3a), 129,4 (C6),
 126,0 (C15), 116,4 (C7), 115,4 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-bromo[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,00 (s, 1H, H10), 8,46 (s, 1H, H8), 8,03 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H13,H17), 7,94 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H14,H16), 7,79 (s, 1H), 7,77 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H6), 7,65 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H7), 7,28 (s, 2H, NH_2).

Espectro de RMN ^1H da 4-sulfamoyl [N'-(benzofuroxan-2-il)methylene]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 164,2 (C11), 148,5 (C15), 147,4 (C8), 136,7
 (C12), 135,5 (C5), 132,6 (C7a), 131,9 (C3a),
 129,0 (C13,C17), 126,1 (C14,C16), 123,9 (C6),
 116,7 (C7), 115,4 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-sulfamoil [N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 11,98 (s, 1H, H10), 8,47 (s, 1H, H8), 7,90 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H14,H16), 7,89 (d, 1H, $J = 9,7$ Hz, H6), 7,82 (s, 1H, H4), 7,70 (d, 1H, $J = 9,7$ Hz, H7), 7,68 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H13,H17).

Espectro de RMN ^1H da 4-iodo[N' -(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 159,8 (C11), 145,4 (C8), 138,0 (C12), 137,8
 (C14,C16), 133,2 (C5), 131,8 (C7a), 130,3
 (C13,C17), 130,0 (C3a), 129,4 (C6), 116,7
 (C7), 115,3 (C4), 99,5 (C15).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-iodo[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz,): δ (ppm): 12,34 (s, 1H, H10), 8,35 (s, 1H, H8), 8,15 (s, 1H, H14), 7,96 (s, 1H, H4), 7,86 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H6), 7,76 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H7), 7,66 (d, 1H, $J_{(17,16)} = 8,1$ Hz, H17), 7,60 – 7,52 (m, 1H, H16).

Espectro de RMN ^1H da 2,4-dicloro[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 162,4 (C11), 146,8 (C8), 135,9 (C13), 135,0
 (C5), 134,1 (12), 132,2 (C15), 131,4 (C17),
 131,2 (C14), 130,7 (C7a), 129,8 (C3a), 129,1
 (C16), 128,0 (C6), 118,6 (C7), 114,6 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C da 2,4-dicloro[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz):

δ (ppm): 11,96 (s, 1H, H10), 8,36 (s, 1H, H8), 8,01 (d, 1H, $J_{(13,17)} = 1,5$ Hz, H13), 7,79 (d, 1H, $J_{(17,16)} = 8,3$ Hz, H17), 7,77 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H6), 7,73 (s, 1H, H4), 7,65 (d, 1H, $J_{(16,17)} = 8,3$ Hz, H16), 7,58 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H7).

Espectro de RMN ^1H da 3,4-dicloro [N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 162,1 (C11), 145,9 (C8), 137,9 (C5), 137,8
 (C15), 135,2 (C12), 134,0 (C14), 131,9 (C16),
 131,6 (C13), 130,3 (C7a), 130,2 (C17), 129,3
 (C3a), 128,6 (C6), 116,7 (C7), 115,5 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C da 3,4-dicloro [N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 8,46 – 8,41 (m, 1H, H6), 8,35 (s, 1H, H2), 8,31 – 8,25 (m, 1H, H5), 3,96 (s, 3H, CH $_3$).

Espectro de RMN ^1H do intermediário 4-nitro-3-(trifluorometil)benzoato de metila.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): 164,9 (C=O), 149,9 (C4), 135,5 (C1), 134,1 (C6), 128,7 (C2), 126,5 (C5), 122,3 (C3), 121,8 (CF $_3$), 53,5 (CH $_3$).

Espectro de RMN ^{13}C do intermediário 4-nitro-3-(trifluorometil)benzoato de metila.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 10,25 (s, 1H, NH), 8,33 (s, 1H, H2), 8,30 (d, 1H, $J_{(6,5)} = 8.3\text{Hz}$, H6), 8,21 (d, 1H, $J_{(5,6)} = 8.3\text{Hz}$, H5), 4,66 (s, 2H, NH $_2$).

Espectro de RMN ^1H do intermediário 4-nitro-3-(trifluorometil)benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 162,8 (C=O), 148,8 (C4), 137,7 (C1), 133,3 (C6), 127,0 (C2), 126,2 (C5), 122,1 (C3), 121,7 (CF $_3$).

Espectro de RMN ^{13}C do intermediário 4-nitro-3-(trifluorometil)benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm): 12,20 (s, 1H, H10), 8,38 (s, 1H, H8), 8,34 (s, 1H, H13), 8,31 (d, 1H, $J = 9,2$ Hz, H6), 8,18 (d, 1H, $J_{(16/17)} = 8,1$ Hz, H16), 7,79 (s, 1H, H4), 7,71 (d, 1H, $J_{(17/16)} = 8,3$ Hz, H17), 7,60 (d, 1H, $J = 9,4$ Hz, H7).

Espectro de RMN ^1H da 4-nitro-3-(trifluorometil)[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
padrão de referência interna: TMS

RMN ^{13}C {H} (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ (ppm):
 163,7 (C11), 149,3 (C15), 147,3 (C8), 137,7
 (C12), 137,3 (C5), 133,5 (C17), 130,5 (C7a),
 129,7 (C3a), 129,3 (C6), 128,3 (C13), 127,0
 (C16), 122,6 (C14), 121,8 (CF $_3$), 117,4 (C7),
 114,4 (C4).

Espectro de RMN ^{13}C da 4-nitro-3-(trifluorometil)[N'-(benzofuroxan-2-il)metileno]benzidrazida.
 padrão de referência interna: TMS

Anexo 2

Controle de turbidez para o preparo do inóculo

Para padronizar a densidade do inóculo, utiliza-se uma solução padrão de turbidez de BaSO₄ (Solução Padrão de McFarland 0,5). O processo consiste nos seguintes passos:

- (1) Preparar a solução padrão de turbidez acrescentando 0,5mL de BaCl₂ 0,048 mol/L (1,175% w/v BaCl₂ • 2H₂O) a 99,5mL de H₂SO₄ 0,18 mol/L (0,36 N) (1% v/v);
- (2) Verificar a densidade correta da solução padrão de turbidez usando um espectrofotômetro com caminho de luz de 1cm e cubeta correspondente para determinar a absorbância. A 625nm, a absorbância deverá ser de 0,08 a 0,10 para a solução padrão McFarland 0,5;
- (3) Colocar de 4 a 6mL em tubos com tampas de rosca, do mesmo tamanho dos usados para cultivar ou diluir o inóculo em cultura de caldo;
- (4) Fechar bem os tubos e armazená-los em câmara escura, a temperatura ambiente;
- (5) Agitar vigorosamente esse padrão de turbidez num misturador de vórtex mecânico imediatamente antes de usar;
- (6) Substituir as soluções padrão ou verificar novamente as densidades três meses depois de preparadas.

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

Anexo 3

Planilhas utilizadas na execução dos ensaios

1 A 50 µg/mL	2 A 20 µg/mL	3 A 10 µg/mL	4 B 50 µg/mL	5 B 20 µg/mL	6 B 10 µg/mL	7 C 50 µg/mL	8 C 20 µg/mL	9 C 10 µg/mL	10 Controle positivo
11 A 50 µg/mL	12 A 20 µg/mL	13 A 10 µg/mL	14 B 50 µg/mL	15 B 20 µg/mL	16 B 10 µg/mL	17 C 50 µg/mL	18 C 20 µg/mL	19 C 10 µg/mL	20 Controle positivo
21 A 50 µg/mL	22 A 20 µg/mL	23 A 10 µg/mL	24 B 50 µg/mL	25 B 20 µg/mL	26 B 10 µg/mL	27 C 50 µg/mL	28 C 20 µg/mL	29 C 10 µg/mL	30 Controle positivo
31 A (branco) 50 µg/mL	32 A (branco) 20 µg/mL	33 A (branco) 10 µg/mL	34 B (branco) 50 µg/mL	35 B (branco) 20 µg/mL	36 B (branco) 10 µg/mL	37 C (branco) 50 µg/mL	38 C (branco) 20 µg/mL	39 C (branco) 10 µg/mL	40 Controle positivo
41 D 50 µg/mL	42 D 20 µg/mL	43 D 10 µg/mL	44 E 50 µg/mL	45 E 20 µg/mL	46 E 10 µg/mL	47 F 50 µg/mL	48 F 20 µg/mL	49 F 10 µg/mL	50 Controle DMSO 1,0%
51 D 50 µg/mL	52 D 20 µg/mL	53 D 10 µg/mL	54 E 50 µg/mL	55 E 20 µg/mL	56 E 10 µg/mL	57 F 50 µg/mL	58 F 20 µg/mL	59 F 10 µg/mL	60 Controle DMSO 1,0%
61 D 50 µg/mL	62 D 20 µg/mL	63 D 10 µg/mL	64 E 50 µg/mL	65 E 20 µg/mL	66 E 10 µg/mL	67 F 50 µg/mL	68 F 20 µg/mL	69 F 10 µg/mL	70 Controle DMSO 1,0%
71 D (branco) 50 µg/mL	72 D (branco) 20 µg/mL	73 D (branco) 10 µg/mL	74 E (branco) 50 µg/mL	75 E (branco) 20 µg/mL	76 E (branco) 10 µg/mL	77 F (branco) 50 µg/mL	78 F (branco) 20 µg/mL	79 F (branco) 10 µg/mL	80 Controle DMSO 0,5%
81 G 50 µg/mL	82 G 50 µg/mL	83 G 20 µg/mL	84 G 20 µg/mL	85 G 10 µg/mL	86 G 10 µg/mL	87	88 LIT (branco)	89 DMSO 1,0% (branco)	90 Controle DMSO 0,5%
91 G 50 µg/mL	92 G (branco) 50 µg/mL	93 G 20 µg/mL	94 G (branco) 20 µg/mL	95 G 10 µg/mL	96 G (branco) 10 µg/mL	97	98 LIT (branco)	99 DMSO 0,5% (branco)	100 Controle DMSO 0,5%

A	
B	
C	
D	
E	
F	
G	

PLANILHA FASE LOG - PREPARO DAS SOLUÇÕES

- A) 25,0 mg + 5,0 mL DMSO = 5000 µg/mL (100% DMSO)
 B) 0,1 mL A + 4,9 mL LIT = 100 µg/mL (2% DMSO)
 C) 2,0 mL A + 3,0 mL LIT = 2000 µg/mL (40% DMSO)
 D) 0,1 mL C + 4,9 mL LIT = 40 µg/mL (0,8% DMSO)
Controle DMSO (CS) = 0,1 mL DMSO + 4,9 mL LIT (2% DMSO)

50 µg/mL = 0,50 mL B + 0,50 mL inóculo

20 µg/mL = 0,50 mL D + 0,50 mL inóculo

10 µg/mL = 0,25 mL D + 0,25 mL LIT + 0,50 mL inóculo

c,DMSO 1,0% = 0,50 mL CS + 0,50 mL inóculo

c, DMSO 0,5% = 0,25 mL CS + 0,25 mL LIT + 0,5 mL inóculo

c, positivo = 0,50 mL LIT + 0,50 inóculo

1 A 50 μM	2 A 25 μM	3 A 5 μM	4 B 50 μM	5 B 25 μM	6 B 5 μM	7 C 50 μM	8 C 25 μM	9 C 5 μM	10 Controle positivo
11 A 50 μM	12 A 25 μM	13 A 5 μM	14 B 50 μM	15 B 25 μM	16 B 5 μM	17 C 50 μM	18 C 25 μM	19 C 5 μM	20 Controle positivo
21 A 50 μM	22 A 25 μM	23 A 5 μM	24 B 50 μM	25 B 25 μM	26 B 5 μM	27 C 50 μM	28 C 25 μM	29 C 5 μM	30 Controle positivo
31 A (branco) 50 μM	32 A (branco) 25 μM	33 A (branco) 5 μM	34 B (branco) 50 μM	35 B (branco) 25 μM	36 B (branco) 5 μM	37 C (branco) 50 μM	38 C (branco) 25 μM	39 C (branco) 5 μM	40 Controle positivo
41 D 50 μM	42 D 25 μM	43 D 5 μM	44 E 50 μM	45 E 25 μM	46 E 5 μM	47 F 50 μM	48 F 25 μM	49 F 5 μM	50 Controle DMSO 1,0%
51 D 50 μM	52 D 25 μM	53 D 5 μM	54 E 50 μM	55 E 25 μM	56 E 5 μM	57 F 50 μM	58 F 25 μM	59 F 5 μM	60 Controle DMSO 1,0%
61 D 50 μM	62 D 25 μM	63 D 5 μM	64 E 50 μM	65 E 25 μM	66 E 5 μM	67 F 50 μM	68 F 25 μM	69 F 5 μM	70 Controle DMSO 1,0%
71 D (branco) 50 μM	72 D (branco) 25 μM	73 D (branco) 5 μM	74 E (branco) 50 μM	75 E (branco) 25 μM	76 E (branco) 5 μM	77 F (branco) 50 μM	78 F (branco) 25 μM	79 F (branco) 5 μM	80 Controle DMSO 0,5%
81 G 50 μM	82 G 50 μM	83 G 25 μM	84 G 25 μM	85 G 5 μM	86 G 5 μM	87	88 LIT (branco)	89 DMSO 1,0% (branco)	90 Controle DMSO 0,5%
91 G 50 μM	92 G (branco) 50 μM	93 G 25 μM	94 G (branco) 25 μM	95 G 5 μM	96 G (branco) 5 μM	97	98 LIT (branco)	99 DMSO 0,5% (branco)	100 Controle DMSO 0,5%

A	
B	
C	
D	
E	
F	
G	

PLANILHA FASE ESTACIONÁRIA – PREPARO DAS SOLUÇÕES

- A) 50000 μM + 5,0 mL DMSO = 10000 μM (100% DMSO)
 B) 0,1 mL A + 4,9 mL LIT = 200 μM (2% DMSO)
 C) 3,0 mL B + 3,0 mL LIT = 100 μM (1% DMSO)
 D) 2,0 mL C + 2,0 mL LIT = 50 μM (0,5% DMSO)
Controle DMSO (CS) = 0,1 mL DMSO + 4,9 mL LIT (2% DMSO)

50 μM = 0,50 mL C + 0,50 mL inóculo

25 μM = 0,50 mL D + 0,50 mL inóculo

5 μM = 0,10 mL D + 0,40 mL LIT + 0,50 mL inóculo

c.DMSO 1,0% = 0,50 mL CS + 0,50 mL inóculo

c. DMSO 0,5% = 0,25 mL CS + 0,25 mL LIT + 0,5 mL inóculo

c. positivo = 0,50 mL LIT + 0,50 inóculo

Anexo 4

***Valores dos descritores calculados e
obtidos da literatura para os
compostos estudados***

				AB_{SA}	AB_{TC}	μ	E_{HOMO}	E_{LUMO}	GAP	ChelpG_C2	ChelpG_C3	ChelpG_C4	ChelpG_C7	ChelpG_O8	ChelpG_N19	ChelpG_O22
7a	H	H	H	4.20	4.77	11.33	-8.06	0.12	-8.18	-0.0980	-0.1368	-0.0563	0.7023	-0.5693	0.6053	-0.0914
7b	CH ₃	H	H	4.10	4.93	11.93	-8.03	0.16	-8.19	0.2433	-0.2654	-0.0212	0.7452	-0.5879	0.5984	-0.0833
7c	NH ₂	H	H	4.24	3.93	14.01	-7.92	0.26	-8.19	0.7617	-0.5104	0.0980	0.7969	-0.6164	0.5970	-0.0843
7d	OH	H	H	4.01	-	10.91	-8.04	0.15	-8.19	0.6582	-0.4617	0.0625	0.7725	-0.5988	0.6073	-0.0876
7e	F	H	H	4.27	4.82	9.56	-8.12	0.06	-8.18	0.5249	-0.3631	0.0192	0.7634	-0.5850	0.6165	-0.0896
7f	CN	H	H	4.02	4.58	7.30	-8.22	-0.08	-8.14	-0.0544	-0.1285	-0.0610	0.7200	-0.5653	0.6015	-0.0830
7g	CH ₂ CH ₃	H	H	-	5.00	12.03	-8.02	0.16	-8.19	0.1346	-0.2130	-0.0463	0.7409	-0.5825	0.6144	-0.0930
7h	OCH ₃	H	H	4.24	4.88	10.83	-8.03	0.16	-8.19	0.5827	-0.3928	0.0167	0.7458	-0.5889	0.5956	-0.0851
7i	Cl	H	H	4.27	5.00	9.42	-8.14	0.03	-8.17	0.0470	-0.0848	-0.1074	0.7299	-0.5758	0.6119	-0.0901
7j	COCH ₃	H	H	4.14	4.80	10.85	-8.14	0.01	-8.15	-0.0819	-0.0754	-0.1126	0.7071	-0.5638	0.6221	-0.0909
7k	N(CH ₃) ₂	H	H	-	-	14.58	-7.87	0.29	-8.16	0.5283	-0.4404	0.0560	0.7455	-0.6006	0.6064	-0.0911
7l	OCH ₂ CH ₃	H	H	-	5.02	11.09	-8.02	0.16	-8.19	0.5483	-0.3916	0.0105	0.7278	-0.5893	0.6127	-0.0921
7m	NO ₂	H	H	4.13	4.75	5.63	-8.35	-1.65	-6.69	0.2690	-0.1407	-0.1328	0.7441	-0.5582	0.6160	-0.0909
7n	CF ₃	H	H	4.38	5.02	8.39	-8.19	-0.03	-8.16	-0.2327	-0.0537	-0.0924	0.7437	-0.5738	0.6132	-0.0875
7o	Br	H	H	4.26	5.11	9.85	-8.12	0.05	-8.16	-0.0288	-0.0412	-0.1278	0.7078	-0.5735	0.6223	-0.0932
7p	SO ₂ NH ₂	H	H	-	4.22	9.97	-8.27	-0.16	-8.11	0.0034	-0.0703	-0.1072	0.7252	-0.5608	0.6058	-0.0839
7q	I	H	H	4.19	5.21	10.04	-8.11	0.05	-8.16	-0.0333	-0.0278	-0.1312	0.7505	-0.5848	0.6058	-0.0853
7r	Cl	H	Cl	4.25	5.02	10.51	-8.16	0.00	-8.16	0.0191	-0.0448	0.0259	0.6676	-0.4974	0.6031	-0.0840
7s	Cl	Cl	H	4.43	5.04	9.66	-8.20	-0.04	-8.16	0.0519	0.0632	-0.0537	0.7534	-0.5620	0.6247	-0.0938
7t	NO ₂	CF ₃	H	4.49	4.80	6.78	-8.12	0.05	-8.17	0.6156	-0.5820	0.0745	0.7499	-0.5954	0.5827	-0.0819

AB_{SA} = atividade frente *S. aureus* (log1/C); AB_{TC} = atividade frente *T. cruzi* (log1/C); μ = momento de dipolo (debye); E_{HOMO} = energia do orbital de fronteira HOMO (eV); E_{LUMO} = energia do orbital de fronteira LUMO (eV); GAP = diferença entre E_{HOMO} e E_{LUMO} ; ChelpG_C2 = carga do potencial eletrostático do átomo de carbono substituído em posição *para* do anel benzênico (R1); ChelpG_C3 = carga do potencial eletrostático do átomo de carbono substituído em posição *meta* do anel benzênico (R2); ChelpG_C4 = carga do potencial eletrostático do átomo de carbono substituído em posição *orto* do anel benzênico (R3); ChelpG_C7 = carga do potencial eletrostático do átomo de carbono carbonílico; ChelpG_O8 = carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio carbonílico; ChelpG_N19 = carga do potencial eletrostático do átomo de nitrogênio da ligação N→O; ChelpG_O22 carga do potencial eletrostático do átomo de oxigênio da ligação N→O.

	<i>ClogP_{SY}</i>	<i>ClogP_{MB}</i>	<i>VW</i>	<i>PSA</i>	<i>Dreiding</i>	<i>ASA</i>	<i>ASA+</i>	<i>ASA-</i>	<i>ASA_h</i>	<i>ASA_p</i>	<i>MR_{MB}</i>	<i>tsei_1</i>	<i>tsei_2</i>	<i>tsei_3</i>	Π	σ	<i>F</i>	<i>R</i>	<i>L</i>	<i>B1</i>	<i>B5</i>	<i>MR</i>
7a	0.86	2.28	232.15	92.95	104.39	493.76	294.18	199.57	361.33	132.42	97.61	1.09	1.05	1.15	0.00	0.00	0.00	0.00	2.06	1.00	1.00	0.10
7b	1.34	2.75	248.92	92.95	106.56	535.88	327.22	208.67	403.43	132.42	102.65	3.76	1.11	1.16	0.56	-0.17	0.01	-0.18	3.00	1.52	2.04	0.57
7c	0.11	1.49	243.03	118.97	105.23	500.89	283.68	217.21	315.39	185.50	102.31	3.04	1.1	1.16	-1.23	-0.66	0.08	-0.74	2.93	1.50	1.97	0.54
7d	0.59	1.99	240.21	113.18	107.52	502.02	280.97	221.05	324.65	177.37	99.95	1.7	1.09	1.15	-0.67	-0.37	0.33	-0.70	2.74	1.35	1.93	0.29
7e	0.96	2.42	236.89	92.95	103.58	500.00	282.54	217.46	334.49	165.51	97.83	0.66	1.08	1.15	0.14	0.06	0.45	-0.39	2.65	1.35	1.35	0.09
7f	0.74	2.09	249.55	116.74	112.49	507.92	291.22	216.70	335.46	172.46	103.33	1.86	1.12	1.16	-0.57	0.66	0.51	0.15	4.23	1.60	1.60	0.63
7g	1.80	3.14	265.78	92.95	122.62	556.20	346.76	209.44	423.78	132.42	107.25	6.96	1.2	1.17	1.02	-0.15	0.00	-0.15	4.11	1.52	3.17	1.03
7h	0.84	2.03	257.78	102.18	150.09	549.71	341.52	208.19	398.82	150.89	104.08	4.72	1.21	1.17	-0.02	-0.27	0.29	-0.56	3.98	1.35	3.07	0.79
7i	1.52	2.80	246.26	92.95	105.06	512.05	283.01	229.04	379.62	132.43	102.42	0.34	1.14	1.17	0.71	0.23	0.42	-0.19	3.52	1.80	1.80	0.60
7j	0.60	1.59	268.13	110.02	114.44	550.01	328.52	221.49	386.83	163.18	108.02	5.84	1.15	1.17	-0.55	0.50	0.33	0.17	4.06	1.90	313	1.12
7k	1.02	2.54	277.83	96.19	133.69	575.30	338.91	236.39	442.88	132.42	112.04	9.24	1.2	1.17	0.18	-0.83	0.10	-0.92	3.53	1.50	1.35	1.56
7l	1.19	2.37	274.64	102.18	150.81	589.02	357.76	231.26	442.29	146.73	108.82	7.83	1.23	1.17	0.38	-0.24	0.26	-0.50	4.92	1.35	3.36	1.25
7m	-1.40	2.23	257.63	138.77	247.67	548.50	310.36	238.14	330.04	218.46	104.94	2.02	1.15	1.16	-0.28	0.78	0.65	0.13	3.49	1.70	2.44	0.74
7n	1.80	3.16	263.56	92.95	109.86	544.44	282.22	262.22	309.11	235.33	103.59	3.33	1.17	1.17	0.88	0.54	0.38	0.16	3.30	1.98	2.61	0.50
7o	1.61	3.07	250.48	92.95	103.8	516.70	270.62	246.08	384.28	132.42	105.24	0.29	1.18	1.17	0.86	0.23	0.45	-0.22	3.83	1.95	1.95	0.89
7p	0.06	0.91	281.62	153.11	173.61	587.78	325.96	261.82	329.02	258.76	109.77	5.23	1.21	1.18	-1.82	0.60	0.49	0.11	3.82	2.11	3.05	1.23
7q	1.44	3.27	256.68	92.95	103.56	522.92	270.91	252.01	390.50	132.42	110.98	0.23	1.23	1.19	1.12	0.18	0.42	-0.24	4.23	2.15	2.15	1.39
7r	2.19	3.31	260.25	92.95	123.07	525.35	253.37	271.98	383.42	141.93	107.22	0.36	1.24	0.45	1.47	0.91	1.27	-0.29	7.04	3.60	3.60	1.21
7s	2.19	3.31	260.25	92.95	105.94	529.29	264.53	264.76	387.06	142.23	107.22	0.41	0.42	1.26	1.48	0.60	1.09	-0.21	7.04	3.60	3.60	1.21
7t	-0.46	3.11	288.94	138.77	22223.49	574.60	266.52	308.08	276.97	297.63	110.91	2.61	3.95	1.28	0.82	1.21	1.29	0.23	6.74	3.68	5.05	1.24

ClogP_{SY} = coeficiente de partição calculado (*SYBYL*); *ClogP_{MB}* = coeficiente de partição calculado (*MarvinBeans*); *VW* = volume de Van der Waals ($\text{\AA}^2$); *PSA* = área de superfície polar; *Dreiding* = energia relacionada com a estabilidade da conformação da molécula (kcal/mol); *ASA* = superfície acessível a solvente, calculada usando o raio do solvente (1,4 $\text{\AA}$ para a molécula de água) ($\text{\AA}^2$); *ASA+* = superfície acessível a solvente de todos os átomos com carga parcial positiva ($\text{\AA}^2$); *ASA-* = superfície acessível a solvente de todos os átomos com carga parcial negativa ($\text{\AA}^2$); *ASA_h* = superfície acessível a solvente de todos os átomos hidrofóbicos ($\text{\AA}^2$); *ASA_p* = superfície acessível a solvente de todos os átomos hidrofílicos ($\text{\AA}^2$); *MR_{MB}* = refratividade molar da molécula ($10^6 [\text{m}^3 \text{mol}^{-1}]$); *tsei_1* = índice de efeito estérico topológico do grupo substituinte em posição para do anel benzênico (R1); *tsei_2* = índice de efeito estérico topológico do grupo substituinte em posição meta do anel benzênico (R2); *tsei_3* = índice de efeito estérico topológico do grupo substituinte em posição orto do anel benzênico (R3); Π = constante de hidrofobicidade Π de Hansch; σ = constante σ de Hammett; *F* = constante de efeito indutivo de Swain e Lupton; *R* = constante de efeito de ressonância de Swain e Lupton; *B1* e *B5* = parâmetros de STERIMOL, desenvolvidos por Verloop; *MR* = refratividade molar do grupo substituinte.

Apêndice 1

Artigos científicos publicados

PAULA, F.R., **JORGE, S.D.**, ALMEIDA, L.V., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L.C. Molecular modeling studies and in vitro bioactivity evaluation of a set of novel 5-nitroheterocyclic derivatives as anti-*T. cruzi* agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17, 2673 – 2679, **2009**. doi:10.1016/j.bmc.2009.02.056

JORGE, S.D., MASUNARI, A., RANGEL-YAGUI, C.O., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L.C. Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17, 3028 – 3036, **2009**. doi:10.1016/j.bmc.2009.03.011

JORGE, S.D., PALACE-BERL, F., MASUNARI, A., CECHINEL, C.A., ISHII, M., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L. C. Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 19, 5031 – 5038, **2011**. doi:10.1016/j.bmc.2011.06.034

ISHII, M., **JORGE, S.D.**, OLIVEIRA, A.A., PALACE-BERL, F., SONEHARA, I.Y., PASQUALOTO, K.F.M., TAVARES, L.C. Synthesis, molecular modeling and preliminary biological evaluation of a set of 3-acetyl-2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazole as potential antibacterial, anti-*Trypanosoma cruzi* and antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. XX, xxxx – xxxx, **2011**. doi:10.1016/j.bmc.2011.09.009

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Molecular modeling studies and in vitro bioactivity evaluation of a set of novel 5-nitro-heterocyclic derivatives as anti-*T. cruzi* agents

Fávero Reisdorfer Paula, Salomão Dória Jorge, Leonardo Viana de Almeida, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, Leoberto Costa Tavares *

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Avenida Lineu Prestes, 580, Bloco 16, São Paulo, 05508-900, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2008

Revised 26 February 2009

Accepted 27 February 2009

Available online 5 March 2009

Keywords:

Nitrocompounds

Molecular modeling

Bioactivity assay

Chagas disease

ABSTRACT

In this study, in vitro anti-*T. cruzi* activity assays of nifuroxazide (NX) analogues, such as 5-nitro-2-furfuryliden and 5-nitro-2-theniliden derivatives, were performed. A molecular modeling approach was also carried out to relate the lipophilicity potential (LP) property and biological activity data. The majority of the NX derivatives showed increased anti-*T. cruzi* activity in comparison to the reference drug, benznidazole (BZN). Additionally, the 5-nitro-2-furfuryliden derivatives presented better pharmacological profile than the 5-nitro-2-theniliden analogues. The LP maps and corresponding ClogP values indicate that there is an optimum lipophilicity value, which must be observed in the design of new potential anti-*T. cruzi* agents.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis or South American trypanosomiasis, is a protozoal disease caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*.¹ It is a chronic and debilitating parasitic infection that affects millions of people in Mexico, Central America, and South America. Approximately 25% of the population of Latin America is at a risk for acquiring the infection. Additionally, as a result of reactivation among immigrant populations, Chagas disease is increasingly being reported in non-endemic settings as in several countries in Europe and various parts of the United States becoming a global problem. An estimated 11 million people are infected worldwide; of these, 15–30% have clinical symptoms.²

The 'burden of disease' is the gap between an ideal situation where every individual in a population lives into old age in full health and the current health of a population affected by the disease. As in all neglected diseases, Chagas disease creates financial and social burdens to the individual, his or her household and country.^{3–5} The early mortality and substantial disability caused by this disease, which often occurs in the most productive population, young adults, results in a devastating economic loss in the Americas. More recent data demonstrate that globally, this disease is associated with 14,000 deaths per year and 0.7 million disability-adjusted life-years (DALYs), constituting the sixth most important neglected tropical disease worldwide.⁶

There are currently two drugs in the treatment of Chagas disease, benznidazole (BZN) (available in the Latin countries) and nifurtimox (available in the United States, under an Investigational New Drug protocol from the CDC Drug Service), which are used in the acute phase and in reactivation in immunosuppressed patients.^{2,7,8} Chagas endemic countries generally use one of two drugs to treat disease victims. Chemotherapy can shorten the acute phase and achieve parasitological cure in 60% of the cases, but because of the adverse effects associated with the two drugs, patients being treated require careful monitoring.^{7,8} In addition, these drugs do not eliminate the parasites, and resistance has been reported.^{2,8} Considering that, it is still necessary to search for new potential antichagasic agents more selective and presenting less toxicity.

Molecular structure modifications might alter physicochemical properties in order to improve drug-receptor interaction and also provide information to elucidate the bioactivity mechanism. Several compounds presenting significant antichagasic activity have been reported,^{9–13} but nifuroxazide (NX) [4-hidroxy-*N*-(5-nitro-2-furfurylidene) benzhydrazide (Fig. 1)], which has a broad antibacterial spectrum, deserves particularly attention regarding the antiprotozoal activity.⁹

Successful studies have been accomplished based on molecular structure modifications of NX, structure–activity relationships, and also considering the evaluation of its derivatives activity against wild and multi-resistant strains of *Staphylococcus*^{14–17} as well as *Mycobacterium* sp.¹⁸

Our research group have designed and synthesized a set of NX analogues. The 5-nitro-2-furfuryliden and 5-nitro-2-theniliden

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 2385; fax: +55 11 3815 6386.
E-mail address: leoberto@usp.br (L.C. Tavares).

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Design, synthesis, antimicrobial activity and molecular modeling studies of novel benzofuroxan derivatives against *Staphylococcus aureus*

Salomão Dória Jorge^{a,*}, Andrea Masunari^a, Carlota Oliveira Rangel-Yagui^b, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto^a, Leoberto Costa Tavares^a

^a Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

^b Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, University of São Paulo, SP 05508-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2008

Revised 6 March 2009

Accepted 9 March 2009

Available online 13 March 2009

Keywords:

Benzofuroxan derivatives

Molecular modification

MIC

MRSA

VISA

Molecular modeling

ABSTRACT

Molecular modification is a quite promising strategy in the design and development of drug analogs with better bioavailability, higher intrinsic activity and less toxicity. In the search of new leads with potential antimicrobial activity, a new series of 14 4-substituted [*N*-(benzofuroxan-5-yl)methylene]benzohydrazides, nifuroxazide derivatives, were synthesized and tested against standard and multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains. The selection of the substituent groups was based on physicochemical properties, such as hydrophobicity and electronic effect. These properties were also evaluated through the lipophilic and electrostatic potential maps, respectively, considering the compounds with better biological profile. Twelve compounds exhibited similar bacteriostatic activity against standard and multidrug-resistant strains. The most active compound was the 4-CF₃ substituted derivative, which presented a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 14.6–13.1 µg/mL, and a *ClogP* value of 1.87. The results highlight the benzofuroxan derivatives as potential leads for designing new future antimicrobial drug candidates.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococcus aureus has been recognized as an important pathogen of humans. Infections caused by this bacteria species can lead to serious consequences, especially in hospitalized patients. The appearance of methicillin resistant strains of *S. aureus*—MRSA—has been a concern all over the world. This situation becomes worse and more threatening regarding the ease of transmission of the pathogen among individuals, resulting in the dissemination of MRSA.¹ The resistance to a great number of antibiotics presented by MRSA makes it difficult to control in hospital environments.² In addition to cross-resistance to all beta-lactamic antibiotics, MRSA has also acquired resistance to macrolides, aminoglycosides, tetracycline, rifampicin and quinolones, remaining the glycopeptides, such as vancomycin, as some of the few therapeutical options.³ Nevertheless, the extensive use of glycopeptides in the past has led to the emergence of glycopeptide-resistant organisms and, consequently, there are recommendations to restrict the use of these agents in the absence of any strong indications.^{4,5} The first clinical high-level vancomycin-resistant *S. aureus*—VRSA—was isolated in 1998.⁶

The emergence of serious staphylococcal infections with reduced susceptibility to vancomycin highlights the need for more antimicrobial therapeutic alternatives with increased potency or enhanced bactericidal activity against MRSA, VISA (vancomycin-intermediate *S. aureus*) and VRSA. Only two new classes have been introduced over the past few decades: the oxazolidinones and the cyclic lipopeptides.⁷ Considering the antimicrobial agents more recently approved for clinical use, just daptomycin (a cyclic lipopeptide), linezolid (an oxazolidinone), and tigecycline (a glycylcycline), present activity against Gram-positive organisms, including MRSA.⁸

In view of the scenario presented above, the search for new and effective antimicrobial agents, resistant to the mechanisms of defense of these bacteria, is of paramount importance. It is well known that the discovery of new drugs having completely new chemical structures is very expensive, involves years of research, and demands the effort of multi-disciplinary teams.^{9,10} Therefore, the optimization of drugs already available can be a good and financially accessible alternative and could provide better and promising antimicrobial agents.¹¹

Since the introduction of nitrofurazone, 2-((5-nitro-2-furyl)methylene)hydrazine carboxamide, in the 40s,¹² hundreds of derivative compounds of 5-nitrofuran were synthesized and evaluated for the antimicrobial activity. These compounds have demonstrated a large spectrum of action, including Gram-negative and Gram-positive bacteria and also some protozoa.¹³ It is important

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30913693; fax: +55 11 38156386.
E-mail address: sdjorge@usp.br (S.D. Jorge).

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay

Salomão Dória Jorge^{a,*}, Fanny Palace-Berl^a, Andrea Masunari^b, Cléber André Cechinel^c, Marina Ishii^a, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto^a, Leoberto Costa Tavares^a

^a Departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

^b Centro Universitário São Camilo, Faculdade de Farmácia, São Paulo, SP 04263-200, Brazil

^c Faculdade de Tecnologia e Ciências, Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Salvador, BA 41714-590, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2011

Revised 8 June 2011

Accepted 12 June 2011

Available online 23 June 2011

Keywords:

Benzofuroxan derivatives

Topliss' approach

MIC

Multidrug resistant *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The aim of this study was the design of a set of benzofuroxan derivatives as antimicrobial agents exploring the physicochemical properties of the related substituents. Topliss' decision tree approach was applied to select the substituent groups. Hierarchical cluster analysis was also performed to emphasize natural clusters and patterns. The compounds were obtained using two synthetic approaches for reducing the synthetic steps as well as improving the yield. The minimal inhibitory concentration method was employed to evaluate the activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains. The most active compound was 4-nitro-3-(trifluoromethyl)[N'-(benzofuroxan-5-yl)methylene]benzhydrazide (MIC range 12.7–11.4 µg/mL), pointing out that the antimicrobial activity was indeed influenced by the hydrophobic and electron-withdrawing property of the substituent groups 3-CF₃ and 4-NO₂, respectively.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Staphylococcus aureus is notorious for its ability to become resistant to antibiotics, and resistance turns it into an important hospital and communitarian pathogenic species of great concern.^{1,2} Since the introduction of penicillin in the 1940s, *S. aureus* has developed resistance to all licensed antibacterial agents.^{3,4} The selection of resistance is an inevitable consequence of the incorrect or inappropriate antibiotic use, and to address this challenge the search for novel antibiotics and/or new therapeutic strategies is needed. In this regard, a major scientific community mobilization has already begun for finding alternatives to treat these multidrug resistant strains.^{5–9} Structure–activity relationship studies, which consider the chemical structure of a certain compound and its ability to exhibit a desirable biological effect, could assuredly contribute to the development of new promising synthetic derivatives.¹⁰

Topliss method is usually employed to guide the choice of substituents in the support of drug design efforts toward the identification of the most potent agents. This method was developed to maximize the chances of synthesizing the most potent compounds in the investigated set as early as possible. Furthermore, it was based upon the assumption that the biological activity depends on the hydrophobic and/or electronic effect of the substituent groups present in the aromatic ring.^{11,12}

The Topliss decision tree considers the change in biological activity for suggesting the next substituent group to be explored. The introduction of a chlorine (4-Cl), for example, led to a more potent than a non-substituted compound, so a 3,4-Cl₂ disubstituted analogue should be synthesized. However, the decision of which compound between the 3,4-Cl₂ and 4-Cl analogues should be the next one in the investigation process will depend on their biological activity values. If the disubstituted compound presents the best activity, then the diagram suggests that the next most active compound would be the 4-NO₂, 3-CF₃ disubstituted derivative, considering the increment of both, the electronic (+σ) and hydrophobic (+π) effects. Otherwise, if the activity values are higher than or equal to the monosubstituted compound (4-Cl), the diagram will follow until the 4-NO₂ compound, suggesting the biological activity depends mainly upon the electronic effect. Coming back to the 4-Cl derivative, when the introduction of a chlorine led to an equipotent analogue in comparison to the parent compound, it can be interpreted as +π and –σ effect. Then, the Topliss scheme suggests the synthesis of a 4-CH₃ analogue, which presents +π and –σ values. Starting at the 4-CH₃ derivative, new branches are suggested to find the most active compounds. Finally, when the 4-Cl analogue is less active than the non-substituted compound, it might imply in the presence of steric hindrance, or the activity would be influenced by –π or –σ effect. In this case, a 4-OCH₃ substituted analogue should be explored.^{11,12}

Benzofuroxan (benzofurazan oxide; benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide) is an interesting ring system which has attracted

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30913693; fax: +55 11 38156386.

E-mail address: sdjorge@usp.br (S.D. Jorge).

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Synthesis, molecular modeling and preliminary biological evaluation of a set of 3-acetyl-2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazole as potential antibacterial, anti-*Trypanosoma cruzi* and antifungal agents

Marina Ishii*, Salomão Dória Jorge, Alex Alfredo de Oliveira, Fanny Palace-Berl, Ieda Yuriko Sonehara, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, Leoberto Costa Tavares

Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Avenida Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 16, Butantã, São Paulo, SP 05508-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 June 2011

Revised 29 August 2011

Accepted 6 September 2011

Available online xxxx

Keywords:

Oxadiazolines

Bacterial resistance

MRSA

VISA

*Trypanosoma cruzi**Candida albicans*

ABSTRACT

A series of 3-acetyl-2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazole derivatives was synthesized and their activity screened in vitro against *Staphylococcus aureus*, *Trypanosoma cruzi*, and *Candida albicans*. The bioactivity was expressed as minimum inhibitory concentration (MIC) for *S. aureus* strains, and as fifty-percent inhibitory concentration (IC₅₀) of parasite population growth for *T. cruzi*. A molecular modeling approach was performed to establish qualitative relationships regarding the biological data and the compounds' physicochemical properties. The 5-(4-OC₄H₉Ph, **5l**), and 5-(4-CO₂CH₃Ph, **5o**) derivatives were the most active compounds for *S. aureus* ATCC 25923 (MIC = 1.95–1.25 µg/mL) and *T. cruzi* (IC₅₀ = 7.91 µM), respectively. Also, a preliminary evaluation against *C. albicans* involving some compounds was performed and the 5-(4-CH₃Ph, **5e**) derivative was the most active compound (MIC = 3.28–2.95 µg/mL). In this preliminary study, all synthesized 3-acetyl-2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazole derivatives were active against all microorganisms tested.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Although many efforts have been made, bacterial and protozoal infections are still responsible for high rates of morbidity and mortality throughout the world, being an important threat to the public health system, especially in the developing countries. It is estimated that about 15.7% of infections are caused by *Staphylococcus aureus*,¹ while *Trypanosoma cruzi* infections affect around 20,000 people per year,^{2,3} and 21,000 deaths are attributed to Chagas' disease every year.²

The incidence of bacterial resistance to antibiotic therapy, including here the emergence of multidrug resistant pathogens, as well as the often poor safety profile and lack of efficacy of the currently available drugs, reinforces the need for the development of new and potent chemical entities or an improvement in the activity of well-known chemical compounds. Considering this statement, the synthesis of analogues can be seen as an efficient approach to optimize an active chemical structure and design new drugs, since simple structural changes can lead to better biological activities through modifications of physicochemical properties.

Since the 1940s, nitroheterocyclic compounds, including derivatives with a five-membered heterocyclic ring,⁴ have been used as

antibacterial⁵ and antiprotozoal⁶ agents and they constitute an important class of heterocyclic compounds presenting high biological activity levels. Other studies, in which the 2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazoline ring was introduced into the molecular structure, have indicated antimicrobial,⁷ anticonvulsant,⁸ antifungal,⁷ and anti-inflammatory⁹ activity related to that structural moiety. The main advantage of the cyclization step, in synthesis, and the introduction of an acetyl group is the presence of an oxadiazole ring that may improve pharmacokinetic efficacy due to its increased ability to establish hydrogen bonding interactions and confer enhanced metabolic stability. Because of that, it could be considered as an important structural motif for designing new drugs.¹⁰

Previous studies^{11,12} showed that molecular modification techniques applied to nitrocompounds is an advantageous strategy for the definition of potential new candidates regarding anti-infective chemotherapy. Thus, in this study, the purpose was the design, synthesis, and evaluation of the biological activity of a novel set of 3-acetyl-2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazole derivatives as an alternative to overcome the currently anti-infective drugs' resistance and, consequently, to establish more effective therapies.

Additionally, a molecular modeling approach was carried out to identify possible qualitative property-activity relationships. For that, the lipophilic (LP) and electrostatic potential (EP) maps were

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 3726; fax: +55 11 3815 6386.

E-mail address: marishii@usp.br (M. Ishii).