UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Síntese e atividade antimicobacteriana de ésteres
do ácido pirazinóico e quinolonas

João Paulo dos Santos Fernandes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Veni Maria Andres Felli

São Paulo
2006

João Paulo dos Santos Fernandes

Síntese e atividade antimicobacteriana de ésteres
do ácido pirazinóico e quinolonas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Veni Maria Andres Felli
orientadora/presidente

Profa. Dra. Liliana Marzorati

Profa. Dra. Márcia da Silva

São Paulo, 12 de setembro de 2006.

À minha amada esposa, amiga, e
mulher Vanessa, por sempre ter me
apoiado e me dado força, e ser minha
“Costelinha” para sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, fonte inesgotável de força, agradeço ao livre-arbítrio e à capacidade de pensar e construir;

À minha orientadora Profa. Dra. Veni Maria Andres Felli, pelos conhecimentos, apoio e liberdade desde o início do curso;

À minha mãe, Profa. Ms. Mara Cinthia P. S. Fernandes, por servir de exemplo e inspiração para buscar ser sempre melhor;

Ao meu pai, João Fernandes Filho, por toda ajuda que prestou a mim, em todos os sentidos, durante minha vida;

Às minhas irmãs, Marília e Mariana, por sempre acreditarem em mim e fazerem me sentir, de alguma forma, importante;

Ao Prof. Anderson Freire Carniel, pelo “empurrão” na vida acadêmica, pelos conhecimentos passados durante a graduação, e pela grande amizade desde então;

Às amigas Profa. Dra. Maria Cristina de Almeida Ribeiro e Profa. Dra. Maria Aparecida Nicoletti, por me ensinarem os primeiros passos na Ciência e pelo exemplo de sapiência a ser seguido;

À Profa. Dra. Liliana Marzorati, pelas sugestões que deram origem a alguns compostos deste trabalho;

Ao médico e amigo Prof. Ms. Luiz Carlos Picca, pela ajuda na revisão de Microbiologia, Patologia e Epidemiologia deste trabalho;

À Profa. Especialista Rosilene Kinue Ito, pela amizade e ajuda desde a Iniciação Científica;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Brandt, por toda a ajuda em Química Orgânica e interpretação de espectros;

À Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira, Profa. Dra. Maria Amélia Barata da Silveira, Prof. Dr. Michael Simon Nothenberg, Profa. Dra. Kerly Fernanda Pasqualoto e Profa. Dra. Carla Maria de Souza Menezes, pelos ensinamentos durante o curso;

Ao Prof. Dr. Márcio Henrique Zaim, pelo auxílio nos procedimentos sintéticos e durante a disciplina de Latenciação;

À amiga Kátia Cirlene Alves Botelho, pela companhia em todas as horas e pela solidariedade;

Aos amigos de laboratório e de Pós-Graduação Carol, Jeanine, Vanessa, Hélio, Gustavo, Charles, Roberto, Camila, Júnior, Kátia Solange, Daniela e Guilherme;

A todos que, de uma forma ou de outra, fizeram parte deste trabalho.

FERNANDES, J. P. S. *Síntese e atividade antimicobacteriana de ésteres do ácido pirazinóico e quinolonas*. 2006. 144p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A tuberculose afeta mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo. Desde a descoberta da rifampicina, em 1965, nenhum outro fármaco importante foi introduzido na terapêutica. A pirazinamida, um dos fármacos disponíveis na terapia da tuberculose, é atualmente considerada um bioprecursor do ácido pirazinóico, porque bactérias resistentes não expressam uma enzima, pirazinamidase, responsável pela conversão da pirazinamida no derivado ácido. Ésteres do ácido pirazinóico apresentam atividade antimicobacteriana, provavelmente por melhor penetração pela parede celular das micobactérias que o derivado ácido. Desta forma, podem ainda atuar em cepas resistentes por serem ativados por esterases. Algumas fluorquinolonas apresentam atividade antimicobacteriana, como o ciprofloxacino, ofloxacino e levofloxacino. O trabalho teve por objetivo obter formas latentes de ácido pirazinóico unindo-o a quinolonas com atividade antimicobacteriana, através de ligação éster, obtendo-se pró-fármacos recíprocos. Um dos compostos sintetizados apresentou atividade *in vitro*, com concentração inibitória mínima comparável ao ciprofloxacino, um dos fármacos mais ativos.

Palavras-chave: pró-fármacos, antimicobacterianos, ácido pirazinóico, fluorquinolonas.

FERNANDES, J. P. S. *Synthesis and antimycobacterial activity of pyrazinoic acid esters and quinolones*. 2006. 144p. Dissertation (mastership) – College of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2006.

Tuberculosis affects over than one billion people around the world. Since the discovery of rifampin, in 1965, no one another important drug was introduced in therapeutics. Pyrazinamide, one of the drugs available in therapy of tuberculosis, is nowadays considered a bioprecursor of pyrazinoic acid, because resistant bacteria do not express an enzyme, pyrazinamidase, responsible by the conversion of pyrazinamide to pyrazinoic acid. Pyrazinoic acid esters exhibit antimycobacterial activity probably to better penetration through mycobacterial cell wall than the acid derivative. So, it could act in resistant strains because is activated by esterases. Some fluoroquinolones exhibit antimycobacterial activity, like ciprofloxacin, ofloxacin and levofloxacin. This work had as objective to obtain latent forms of pyrazinoic acid linking it to quinolones with antimycobacterial activity, through an ester bond, obtaining mutual prodrugs. One of the synthesized compounds showed activity *in vitro*, with minnimal inhibitory concentration comparable to ciprofloxacin, one of most active drugs.

Key words: prodrugs, antimycobacterial agents, pyrazinoic acid, fluoroquinolones.

Figura 1	Incidência da tuberculose no mundo, incluindo todas as formas da doença (pulmonar, extrapulmonar e miliar), por cada 100.000 pessoas	15
Figura 2	Representação esquemática da parede celular do <i>M. tuberculosis</i>	20
Figura 3	Isoniazida	38
Figura 4	Produtos formados na reação da isoniazida com a catalase-peroxidase micobacteriana	38
Figura 5	Rifampicina	40
Figura 6	Rifapentina	42
Figura 7	Pirazinamida	42
Figura 8	Ácido pirazinóico e pró-fármacos ésteres	44
Figura 9	Etambutol	45
Figura 10	Estreptomicina	46
Figura 11	Etionamida	48
Figura 12	Mecanismo de ação da etionamida	48
Figura 13	Ácido <i>p</i> -aminossalicílico	49
Figura 14	Ciclosserina	50
Figura 15	Estrutura geral das quinolonas	51
Figura 16	Principais quinolonas antimicobacterianas. ciprofloxacino; esparfloxacino; ofloxacino (levofloxacino); moxifloxacino	54
Figura 17	Esquema de bioativação da ciclofosfamida, liberando a mostarda nitrogenada alquilante	58
Figura 18	Método de síntese dos ésteres do ácido pirazinóico através da reação com cloreto de acila	65
Figura 19	Método de síntese dos ésteres do ácido pirazinóico através da reação com DCC	66
Figura 20	Método de síntese dos ésteres do ácido pirazinóico por substituição nucleofílica	66
Figura 21	Método de síntese dos pró-fármacos recíprocos de fluorquinolonas e ácido pirazinóico por substituição nucleofílica	67
Figura 22	Esquema de síntese dos pró-fármacos recíprocos de fluorquinolonas e ácido pirazinóico pela reação com cloreto de acila	67
Figura 23	Esquema de síntese do pirazinoato de 2-hidroxietila pela reação com DCC	69
Figura 24	Esquema de síntese do pirazinoato de 2-hidroxietila pela reação com cloreto de pirazinoíla	70
Figura 25	Esquema de síntese do pirazinoato de 2-hidroxietila por catálise por transferência de fase (CTF)	70
Figura 26	Esquema de síntese do pirazinoato de 2-cloroetila pela reação com cloreto de pirazinoíla	71
Figura 27	Esquema de síntese do pirazinoato de 2-iodoetila	71

Figura 28	Esquema de síntese do pirazinoato de etila por CTF	72
Figura 29	Esquema de síntese do pirazinoato de etila utilizando carbonato de sódio	72
Figura 30	Esquema de síntese do pirazinoato de etila utilizando DBU	73
Figura 31	Esquema de síntese do pirazinoato de etila utilizando TEA	73
Figura 32	Esquema de síntese do pirazinoato de hexila utilizando carbonato de sódio	74
Figura 33	Esquema de síntese do pirazinoato de hexila utilizando DBU	74
Figura 34	Esquema de síntese do pirazinoato de hexila utilizando TEA	75
Figura 35	Esquema de síntese do pirazinoato de 3-bromopropila utilizando TEA	75
Figura 36	Esquema de síntese do pirazinoato de 3-bromopropila utilizando pirazinoato de potássio	76
Figura 37	Esquema de síntese do dipirazinoato de 1,3-propanodiila utilizando TEA	76
Figura 38	Esquema de síntese do éster 2-cloroetilico do ofloxacino pela reação com cloreto de acila	77
Figura 39	Esquema de síntese do éster 2-hidroxietílico do ofloxacino por irradiação de microondas a 540W, utilizando-se 2-cloroetanol	78
Figura 40	Esquema de síntese do éster 2-hidroxietílico do ofloxacino por irradiação de microondas a 630W, utilizando-se 2-cloroetanol	78
Figura 41	Esquema de síntese do éster 2-hidroxietílico do ofloxacino pela reação com 2-bromoetanol e TEA em DMF	79
Figura 42	Esquema de síntese do éster 2-hidroxietílico do ofloxacino pela reação com 2-bromoetanol e TEA em MeCN	79
Figura 43	Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e TEA	80
Figura 44	Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e carboxilato de potássio	80
Figura 45	Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e carbonato de potássio	81
Figura 46	Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ciprofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e TEA em DMF	82
Figura 47	Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ciprofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e TEA em MeCN	83
Figura 48	Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ciprofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e carbonato de potássio	83
Figura 49	Esquema de síntese do éster 2-hidroxietílico do ciprofloxacino pela reação com 2-bromoetanol e TEA	84
Figura 50	Esquema de síntese do pró-fármaco mútuo de ácido pirazinóico e ofloxacino utilizando DBU	85
Figura 51	Esquema de síntese do pró-fármaco mútuo de ácido pirazinóico e ofloxacino por CTF	85
Figura 52	Esquema de síntese do pró-fármaco mútuo de ácido pirazinóico e ofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e DBU	86

Figura 53	Esquema de síntese do 2-iodoetanol	87
Figura 54	Esquema de síntese do 2-bromoetanol	88
Figura 55	Pirazinoato de 2-hidroxietila	91
Figura 56	Pirazinoato de 2-cloroetila	91
Figura 57	Pirazinoato de 2-iodoetila	92
Figura 58	Pirazinoato de etila	92
Figura 59	Pirazinoato de hexila	94
Figura 60	Pirazinoato de 3-bromopropila	95
Figura 61	Dipirazinoato de 1,3-propanodila	95
Figura 62	Éster 2-cloroetílico do ofloxacino	96
Figura 63	Éster 2-hidroxietílico do ofloxacino	96
Figura 64	Éster 3-bromopropílico do ofloxacino	98
Figura 65	Éster 3-bromopropílico do ciprofloxacino	98
Figura 66	Éster 2-hidroxietílico do ciprofloxacino	99
Figura 67	Pró-fármaco mútuo do ácido pirazinóico e ofloxacino com espaçante etilênico	100
Figura 68	Pró-fármaco mútuo do ácido pirazinóico e ofloxacino com espaçante propilênico	100
Figura 69	2-Iodoetanol	101
Figura 70	2-Bromoetanol	101
Figura 71	Possíveis produtos formados na reação entre ofloxacino e 1,3-dibromopropano	108
Figura 72	Formação de ligação de hidrogênio intramolecular no ofloxacino	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Esquema básico (esquema I) para tratamento de casos novos de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar, exceto TB meningoencefálica	34
Tabela 2	Esquema básico + etambutol (esquema IR), para casos de recidiva após cura ou retorno após abandono do esquema I	35
Tabela 3	Esquema para tratamento da tuberculose meningoencefálica (esquema II)	35
Tabela 4	Esquema para falência (esquema III) do esquema I ou IR	36
Tabela 5	Correlação heteronuclear entre espectros de RMN de ^1H e ^{13}C	96
Tabela 6	Concentração inibitória mínima (CIM) obtida para o ácido pirazinóico, ciprofloxacino e pirazinoato de 2-cloroetila utilizando o método da microdiluição em tubos e detecção com Alamar Blue (MABA)	100

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Tuberculose	19
2.1.1. Agente Etiológico e Transmissão	19
2.1.2. Patogênese	21
2.1.3. Aspectos Clínicos	24
2.1.4. Epidemiologia	25
2.2. Controle e Prevenção da Tuberculose	30
2.2.1. Vacina BCG (bacilo Calmette-Guerin)	30
2.2.2. Quimioprofilaxia primária	31
2.2.3. Quimioprofilaxia secundária	31
2.2.4. Tratamento	32
2.3. Fármacos Antimicobacterianos	37
2.3.1. Isoniazida	37
2.3.2. Rifamicinas	40
2.3.3. Pirazinamida	42
2.3.4. Etambutol	45
2.3.5. Estreptomicina	46
2.3.6. Etionamida	47
2.3.7. Ácido <i>p</i> -aminossalicílico (PAS)	49
2.3.8. Ciclosserina	50
2.3.9. Fluorquinolonas	51
2.4. Desenvolvimento de fármacos	55
2.4.1. Latenciação de fármacos	56
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	61
3.1. Justificativa	61
3.2. Objetivos	62
4. MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1. Materiais	63
4.2. Metodologia	65
4.2.1. Obtenção do éster do ácido pirazinóico	65
4.2.2. Obtenção do éster da quinolona	66
4.2.3. Identificação	67
4.2.4. Ensaio biológico preliminar <i>in vitro</i>	67
5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	69
5.1. Síntese do éster do ácido pirazinóico	69
5.1.1. Preparação do pirazinoato de 2-hidroxietila	69
5.1.2. Preparação do pirazinoato de 2-cloroetila	70
5.1.3. Preparação do pirazinoato de 2-iodoetila	71
5.1.4. Preparação do pirazinoato de etila	71
5.1.5. Preparação do pirazinoato de hexila	73
5.1.6. Preparação do pirazinoato de 3-bromopropila	75
5.1.7. Preparação do dipirazinoato de 1,3-propanodila	76

5.2. Síntese do éster do ofloxacino	77
5.2.1. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-cloroetila	77
5.2.2. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-hidroxietila	77
5.2.3. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-methyl-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 3-bromopropila	79
5.3. Síntese do éster do ciprofloxacino	82
5.3.1. Preparação do 1-ciclopropil-6-flúor-4-oxo-7-piperazin-1-il-1,4-diidro-quinolino-3-carboxilato de 3-bromopropila	82
5.3.2. Preparação do 1-ciclopropil-6-flúor-4-oxo-7-piperazin-1-il-1,4-diidro-quinolino-3-carboxilato de 2-hidroxietila	83
5.4. Síntese do pró-fármaco mútuo de ácido pirazinóico e ofloxacino	85
5.4.1. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-(pirazino-2-carbonilóxi)-etila	85
5.4.2. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 3-(pirazino-2-carbonilóxi)-propila	86
5.5. Síntese do 2-iodoetanol	87
5.6. Síntese do 2-bromoetanol	88
5.7. Síntese dos carboxilatos	89
5.7.1. Preparação do pirazinoato de potássio	89
5.7.2. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de potássio	89
5.8. Ensaio Biológico Preliminar <i>In Vitro</i>	90
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
6.1. Resultados	91
6.1.1. Pirazinoato de 2-hidroxietila	91
6.1.2. Pirazinoato de 2-cloroetila	91
6.1.3. Pirazinoato de 2-iodoetila	92
6.1.4. Pirazinoato de etila	92
6.1.5. Pirazinoato de hexila	94
6.1.6. Pirazinoato de 3-bromopropila	95
6.1.7. Dipirazinoato de 1,3-propanodiila	95
6.1.8. 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-cloroetila	96
6.1.9. 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-hidroxietila	96
6.1.10. 8-flúor-3-metil-9-(4-methyl-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 3-bromopropila	98
6.1.11. 1-ciclopropil-6-flúor-4-oxo-7-piperazin-1-il-1,4-diidro-quinolino-3-carboxilato de 3-bromopropila	98
6.1.12. 1-ciclopropil-6-flúor-4-oxo-7-piperazin-1-il-1,4-diidro-quinolino-3-carboxilato de 2-hidroxietila	99
6.1.13. 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-(pirazino-2-carbonilóxi)-etila	100
6.1.14. 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 3-(pirazino-2-carbonilóxi)-propila	100
6.1.15. 2-iodoetanol	101
6.1.16. 2-bromoetanol	101

6.1.17. Ensaio biológico preliminar <i>in vitro</i>	101
6.2. Discussão	102
<u>7. CONCLUSÃO</u>	<u>113</u>
<u>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>114</u>
<u>9. ANEXOS</u>	<u>126</u>

A tuberculose afeta mais de um bilhão de pessoas no mundo inteiro, apesar dos consideráveis esforços desenvolvidos nas últimas três décadas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2004), um terço da população mundial está infectada e 30 milhões morrerão nesta década (figura 1). São estimados mais de 8 milhões de casos novos a cada ano com grande impacto na economia (BLOOM, 1994; BAKER *et al.*, 1996; SILVA & FERREIRA, 1999; RANDO *et al.*, 2002). No Brasil, a situação não é diferente, pois existem mais de 80.000 casos novos por ano, sendo mais de 18.000 em São Paulo e, destas pessoas, 3.000 morrerão por ano. A região Sudeste, com grandes grupos populacionais desprovidos de sistemas adequados de saneamento e promoção de saúde, apresenta condições favoráveis à propagação do bacilo da tuberculose, sendo a região de maior incidência no Brasil (SILVA & FERREIRA, 1999).

Figura 1: Incidência da tuberculose no mundo, incluindo todas as formas da doença (pulmonar, extrapulmonar e miliar), por cada 100.000 pessoas (WHO, 2004).

Antes considerada moléstia infecciosa sob controle, a tuberculose (TB) ressurge como sério problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, onde a ausência de recursos e o emprego de programas de

controle inadequados mantiveram elevados os índices de incidência e prevalência (BLOOM, 1994; KONEMAN *et al.*, 1989).

As medidas de caráter profilático incluem a vacinação e quimioprofilaxia, sendo a segregação do paciente recomendada apenas em casos severos por curtos períodos. A quimioprofilaxia visa a prevenção do desenvolvimento de tuberculose pela administração de quimioterápicos a indivíduos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* que não desenvolveram a doença, e a indivíduos sob alto risco de contágio (BRASIL, 2002). Além dos benefícios diretos pela proteção individual, a grande importância da quimioprofilaxia está na interrupção da propagação do bacilo a partir de doente bacilífero. A isoniazida é recomendada para este procedimento devido à sua comprovada capacidade de reduzir o desenvolvimento da doença (BLOOM, 1994). Vários fármacos encontram-se disponíveis para o tratamento da tuberculose, entretanto, este é dificultado pelo custo alto da terapia e aparecimento de resistência aos fármacos utilizados (DONG *et al.*, 1998).

Os fármacos agora disponíveis para o tratamento da tuberculose foram descobertos em um período de duas décadas (1944-1965), durante o qual houve uma procura relativamente intensa por laboratórios de indústrias e laboratórios ligados às indústrias. Entretanto, desde a descoberta da rifampicina em 1965, nenhum outro antimicobacteriano importante foi introduzido na terapêutica. Este fato reforça a impressão de que nos anos recentes muitos laboratórios deram baixa prioridade à tuberculose. Nenhum fármaco novo foi desenvolvido devido à falta de interesse (SILVA & FERREIRA, 1999).

Há um decréscimo no interesse pela procura de novos antimicobacterianos pelas indústrias farmacêuticas. A primeira razão para isso é o sucesso obtido nas terapias de curto prazo, envolvendo combinações de fármacos poderosos disponíveis e levando à idéia falsa de que não há necessidade real para outros fármacos. Em segundo lugar, o fato de que o sistema de avaliação para detecção de novos antimicobacterianos, em larga escala, consome muito tempo e, ainda, alguns problemas relacionados ao manuseio dos patógenos. Em terceiro lugar, o desenvolvimento de um fármaco antimicobacteriano requer mais tempo e recursos humanos que o desenvolvimento de outros agentes antimicrobianos (KAUFMANN,

2000). E, finalmente e provavelmente a razão mais importante, a tuberculose é predominante em países em desenvolvimento com poucos recursos econômicos e os laboratórios de indústrias são relutantes em investir na pesquisa de produtos novos a serem usados em áreas geográficas onde não existe proteção das patentes (SESIN, MANZI, PACHECO, 1996; SILVA & FERREIRA, 1999).

Atualmente, existe uma preocupação mundial em relação à doença. O principal problema, o abandono do tratamento, faz com que os bacilos tornem-se resistentes aos medicamentos e estes deixam de surtir efeito. A tuberculose resistente pode desencadear uma nova onda da doença virtualmente incurável em todo o mundo (SILVA & FERREIRA, 1999).

As descobertas acerca dos mecanismos biológicos do *M. tuberculosis*, especialmente no campo da biologia molecular, podem trazer uma nova luz ao entendimento dos processos patológicos e do desenvolvimento da resistência aos fármacos. Mais recentemente, o esclarecimento das bases genéticas do bacilo tem contribuído para o desenvolvimento de vacinas que surgem como nova e promissora ferramenta para imunização (REED & LOBET, 2005). Contudo, todos os esforços na busca do desenvolvimento tecnológico aplicado ao controle da tuberculose serão insuficientes se medidas de melhoria das condições sócio-econômicas das populações mais atingidas não forem aplicadas (BAKER *et al.*, 1996).

O surgimento da tuberculose multi-resistente (TBMR) aos fármacos utilizados, definida como resistência a pelo menos dois fármacos, sendo pelo menos um deles a isoniazida ou a rifampicina (SOMMERS & GOOD, 1985; RANDO *et al.*, 2002), e da pandêmica combinação da tuberculose com a AIDS, difíceis de tratar e com necessidade de utilizar fármacos mais tóxicos e mais caros, tornaram importante a procura por fármacos ou terapias mais eficientes para o tratamento da tuberculose (ISEMAN, 1993; DONG *et al.*, 1998; GILLESPIE & BILLINGTON, 1999; KAWAKAMI *et al.*, 2000; RAGNO *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de novos fármacos antimicobacterianos é necessário já que é comum o aparecimento de resistência dos agentes patogênicos aos fármacos disponíveis, principalmente quando utilizado em monoterapia. Essa medida, nos dias

atuais, começa a tornar-se urgente, devido ao crescimento de infecções causadas por cepas resistentes a múltiplos fármacos e também das infecções oportunistas, como pelo complexo *M. avium-intracellulare*, que acomete principalmente pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Diversos são os métodos de obtenção de fármacos, sendo a modificação molecular, um dos recursos mais promissores, ainda na atualidade (WERMUTH, 1996). Nesta linha, a latenciação é um método de modificação molecular que visa transportar o fármaco, utilizando para tal derivatizações químicas biorreversíveis a fim de se obter os denominados fármacos latentes. Por definição, a latenciação consiste na transformação química de um fármaco a uma forma de transporte inativa que, *in vivo*, libera o fármaco através de transformação química ou enzimática (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). Entre os problemas que podem ser resolvidos com esse método, citam-se as possibilidades de aumentar a biodisponibilidade do fármaco, prolongar sua ação, reduzir a toxicidade, aumentar seletividade de ação e também resolver problemas de formulação (BUNDGAARD, 1991; CHUNG & FERREIRA, 1999).

As formas latentes de fármacos antimicobacterianos podem ser consideradas uma forma de reduzir o número de doses, bem como reduzir a duração do esquema terapêutico preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2002) e pela OMS (WHO, 2005). Além disso, a utilização de pró-fármacos mútuos possibilita a ação sinérgica entre os fármacos ligados covalentemente, em que, após a liberação, cada um realizará seu mecanismo de ação particular, porém com melhoria de suas propriedades farmacocinéticas (MENGER & ROURK, 1997).

Com base nessas considerações, propõe-se neste trabalho a síntese de pró-fármacos mútuos de ácido pirazinóico e quinolonas, fármacos com atividade tuberculostática¹ conhecida, e a avaliação da atividade antimicobacteriana em cepas resistentes ou não de agentes causadores da tuberculose e outras micobacterioses.

¹ Pela etimologia da palavra, o termo “tuberculostático” sugere “agentes que paralisam o crescimento/multiplicação dos microrganismos”. Porém, o termo deve ser entendido como “agentes dotados de atividade antimicrobiana contra *M. tuberculosis*”.

2.1. Tuberculose

2.1.1. Agente Etiológico e Transmissão

Micobactérias são bactérias de forma alongada, aeróbicas, não-esporuladas e imóveis, com um revestimento céreo que lhes conferem a propriedade de resistir à descoloração quando tratadas com combinações álcool e ácido, sendo, portanto, chamadas de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) (JAWETZ, MELNICK, ADELBERG, 1974). Evolutivamente, encontram-se entre as bactérias e fungos, por isso o nome dado à família a qual pertencem, *Mycobacteriaceae*. O gênero de maior importância, *Mycobacterium*, engloba bacilos de interesse clínico, já que são patogênicos, como o *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. bovis*, além do complexo *M. avium-intracellulare* (MAC), patógenos oportunistas principalmente em pessoas imunodeprimidas, como indivíduos portadores do vírus HIV (SAMUELSON, 2000).

O *M. tuberculosis*, principal agente causador da tuberculose, foi primeiramente isolado e identificado por Robert Koch em 1882. Em homenagem ao cientista alemão, o bacilo ficou conhecido como Bacilo de Koch (BK) (SOUZA & VASCONCELOS, 2005).

Entre as principais características observadas nas micobactérias, citam-se o crescimento lento, a ausência da produção de toxinas e a dificuldade de descoloração. Essa dificuldade é propiciada pela quantidade anormal de lipídios em sua parede celular. Esta parede celular pode ser considerada única quanto à sua estrutura e complexidade, e a esse fato é atribuída a patogenicidade e a virulência do microrganismo, resistência a fármacos, permeabilidade celular, imunorreatividade e persistência e recrudescência da doença (ROUHI, 1999; LEMKE, 2002).

Como a parede celular é um possível alvo para a ação de quimioterápicos, é inteligível a preocupação de definir sua estrutura química. Essa estrutura é composta de um polímero complexo associado à membrana plasmática, formando uma camada de peptidoglicana de *N*-acetil-D-glucosaminas ligadas alternadamente com

ácidos *N*-glicosil-D-murâmicos através de ligações 1-4, sendo este polímero ligado a cadeias peptídicas de L-alanina, D-glutamina, ácido meso-diaminopimérico e D-alanina. Um espaçante conecta o ácido murâmico a uma cadeia poligalactana e poliarabinose, chamada de camada arabinogalactana, sendo que as cadeias arabinosídicas terminam ligadas a ácidos micólicos. E, finalmente, presa à membrana plasmática, há uma porção fosfatidilinositol ligada a lipídeos e ao polímero poliarabinosil-polimanana, chamada de camada lipoarabinomanana (LAM) (MINNIKIN, 1991; McNEIL & BRENNAN, 1991; LEMKE, 2002). A representação esquemática da parede celular micobacteriana pode ser observada na figura 2.

Figura 2: Representação esquemática da parede celular do *M. tuberculosis* (adaptado de LEMKE, 2002).

Duas espécies de micobactérias causam tuberculose: complexo *M. tuberculosis* (compreendido pelo *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, entre outros) e *M. bovis*. O complexo *M. tuberculosis* é transmitido, principalmente, por núcleos de perdigotos produzidos durante a tosse, espirro ou fala do indivíduo infectado pela bactéria. As pequenas gotículas espalhadas são suficientes para alcançar os alvéolos pulmonares, onde o germe inicia sua multiplicação no interior dos macrófagos alveolares (LEITE, 2001). Já o *M. bovis* é transmitido através do

leite de vacas infectadas, que quando ingerido, produz, primeiramente, lesões intestinais ou amigdalíneas (SAMUELSON, 2000).

O complexo *M. avium-intracellulare*, duas micobactérias intimamente ligadas, possuem virulência muito baixa em hospedeiros normais, porém, causam infecções disseminadas em 15 a 24% dos pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (LONG *et al.*, 1996). Podem infectar também pessoas com o pulmão debilitado pelo tabagismo prolongado, por tuberculose pulmonar, bronquite, enfisema ou outras doenças. Contrariamente à tuberculose, a infecção por MAC não pode ser passada de uma pessoa para outra (MERCK, 2005).

2.1.2. Patogênese

A capacidade do *M. tuberculosis* de se evadir da destruição por macrófagos e induzir hipersensibilidade do tipo tardio regula a patogenicidade da bactéria (QUINN, NEWMAN, KING, 1996). Existem vários fatores encontrados na parede celular da micobactéria que estão relacionados com essa capacidade.

O primeiro fator, chamado de fator corda, é um glicolípídeo de superfície que induz a formação de granulomas típicos. Este fator leva o *M. tuberculosis* a crescer formando cordões sinuosos *in vitro*, sendo que as cepas virulentas apresentam esse fator em sua superfície, enquanto que as avirulentas não o têm. O segundo fator é o LAM, pois este apresenta estrutura semelhante às endotoxinas de bactérias Gram-negativas. Possui a propriedade de inibir a ativação dos macrófagos via interferona γ (IFN- γ), induzir a secreção de fator de necrose tumoral α (FNT- α), causando febre, e de interleucina 10 (IL-10), que inibe a proliferação das células T. O complemento ativado na superfície da micobactéria é o terceiro fator, podendo opsonizar o microrganismo e facilitar sua captura pelo receptor do complemento 3 no macrófago sem desencadear a cadeia respiratória, que pode destruir o microrganismo por gerar espécies reativas de oxigênio. E, finalmente, o quarto fator, uma proteína do choque térmico do *M. tuberculosis* de 65kD altamente imunogênica que é semelhante às proteínas humanas do choque térmico e que pode ter papel nas reações auto-imunes induzidas pelo *M. tuberculosis* (SAMUELSON, 2000; RAJA, 2004).

O *M. tuberculosis* reside em fagossomas, que não se fundem aos lisossomas (CLEMENS, 1996). A inibição da fusão fagossoma-lisossoma é associada à secreção de urease pela micobactéria, aumentando a concentração de amônia no local, e também à captação do bacilo por receptores de manose e do complemento, e não pelos receptores Fc, comum à captação de outras bactérias.

O desenvolvimento da hipersensibilidade do tipo IV (ou tardio) contra o *M. tuberculosis* pode explicar a destruição deste nos tecidos, assim como o aparecimento da resistência contra os microrganismos. A resposta inflamatória à exposição inicial ao *M. tuberculosis* é inespecífica, como em qualquer outra infecção bacteriana. Porém, em 2 ou 3 semanas, a reação torna-se granulomatosa, sendo que esses grânulos tornam-se caseosos, formando os “tubérculos moles”. O indivíduo apresentará reação primária ou secundária, dependendo se a infecção for causada por uma primeira exposição ou ocorrer em uma pessoa já sensibilizada (SAMUELSON, 2000).

A infecção primária pelo *M. tuberculosis* inicia-se com a inalação do bacilo e termina com a resposta imune celular, que controla a maioria das infecções e induz à hipersensibilidade tardia. Nos alvéolos, os bacilos são fagocitados por macrófagos e transportados para linfonodos hiliares. Macrófagos inexperientes não conseguem destruir as micobactérias, que se multiplicam, infectam outros macrófagos e podem se disseminar pelo sistema circulatório para outras partes do pulmão ou para outros órgãos (SAMUELSON, 2000). Após algumas semanas, sobrevém imunidade celular, sendo que as células T ativadas interagem com macrófagos de três maneiras. Na primeira, as células T CD4⁺ secretam IFN- γ , ativando macrófagos para destruir as micobactérias intracelulares através de espécies reativas de nitrogênio, como NO, NO₂ e HNO₃. Na segunda, as células T CD8⁺ rompem os macrófagos infectados e destroem as micobactérias (STENGER *et al.*, 1997). E, na terceira, as células T CD4⁻ e CD8⁻ lisam os macrófagos, porém, sem destruir as micobactérias, sendo o resultado dessa lise a formação de lesões caseosas. As micobactérias não crescem nesse ambiente devido à baixa concentração de O₂, e a infecção torna-se latente (RAJA, 2004).

A infecção secundária pode ocorrer por reinfecção ou por reativação da infecção latente, podendo progredir para a doença disseminada, também chamada tuberculose miliar. Isto pode ocorrer por causa da virulência da cepa ou ainda pela suscetibilidade individual do hospedeiro. Os granulomas da tuberculose secundária ocorrem mais freqüentemente no ápice dos pulmões, mas podem disseminar-se amplamente pelos pulmões, rins, meninges, medula óssea e outros órgãos. Esses granulomas, que não contêm a propagação da infecção, são a causa principal de lesão tecidual na tuberculose. A necrose caseosa e a formação de cavidades são características especiais da tuberculose doença. Os granulomas podem romper-se, disseminando os microrganismos para outros tecidos e para as vias aéreas, liberando o agente etiológico em aerossóis (SAMUELSON, 2000).

A tuberculose miliar ocorre quando há a disseminação das micobactérias pelo sangue, causando lesões em outros órgãos. Essas lesões amareladas assemelham-se a grãos de milho, daí o nome miliar. Certos tecidos são mais resistentes à infecção pelo *M. tuberculosis*, sendo, portanto, raro encontrar tubérculos no coração, músculo estriado, tireóide e pâncreas (SAMUELSON, 2000). Em certos casos, os microrganismos são destruídos em todos os tecidos, mas persistem em apenas um órgão, sendo os mais comuns os pulmões, linfonodos, meninges, rins, supra-renais, ossos, tubas uterinas e epidídimo.

A co-infecção tuberculose/HIV pode ocorrer em indivíduos moderadamente imunodeprimidos, nos quais a infecção pelo *M. tuberculosis* freqüentemente é causada por reativação ou exposição a novas micobactérias (SILVA & FERREIRA, 1999). Pelo fato do HIV infectar as células T e os macrófagos, a resposta imune do hospedeiro torna-se defeituosa, sendo que os linfócitos T CD4+ não secretam linfocinas para ativar a destruição das micobactérias, ou os macrófagos infectados pelo vírus tornam-se incapazes de responder a essas linfocinas (SAMUELSON, 2000; RAJA, 2004). A infecção oportunista por *M. avium-intracellulare* pode ocorrer em indivíduos intensamente imunodeprimidos. Essa infecção ocorre pelo trato gastrointestinal, já que essas micobactérias são encontradas principalmente na água (PRIMM, LUCERO, FALKINHAM III, 2004). Os granulomas, linfócitos e destruição tecidual são raros.

2.1.3. Aspectos Clínicos

- *Tuberculose pulmonar*

A porta de entrada natural para o *M. tuberculosis* é o pulmão, órgão onde as manifestações clínicas são mais freqüentes e de maior importância epidemiológica. O comprometimento pulmonar continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade da tuberculose em todo o mundo (WHO, 2004). Após a infecção primária, muitos dos indivíduos conseguem barrar a multiplicação dos bacilos com o desenvolvimento de uma resposta imune específica, representada pelo granuloma e sua posterior calcificação. Antes desse desenvolvimento, o bacilo poderá disseminar-se pelos tecidos pela via linfática e pela via hematogênica, sendo contido também por desenvolvimento de resposta específica (GRANGE, 1998). Uma pequena parte desses indivíduos recém infectados poderá progredir para uma forma grave da doença (JAGIRDAR & ZAGAZG, 1996), representada pelo acometimento de órgãos como o sistema nervoso central, pulmões e órgãos linfáticos. São fatores predisponentes para esta progressão a baixa idade e imunossupressão.

Nos dois anos subseqüentes ao contato primário, cerca de 3 a 5% dos indivíduos desenvolvem doença ativa, e o risco de desenvolvimento da doença após esse período é de 5 a 7% por toda a vida, pela reativação endógena. Nessas situações, o indivíduo contaminado desenvolverá tuberculose doença, sendo o principal órgão-alvo o pulmão. Tosse prolongada mucossangüinolenta, febre, sudorese noturna e emagrecimento são as manifestações mais comuns (SAMUELSON, 2000).

A tuberculose fibrocavária descreve o processo que ocorre com a erosão de um bronquíolo, cujo foco caseoso transforma-se em uma cavidade cinza-amarelada circundada por tecido fibroso que propicia novamente o crescimento do bacilo, por aumentar a tensão de O₂ no local (SAMUELSON, 2000). Geralmente, esse tipo de lesão localiza-se no ápice, porém pode ocorrer em vários ou todos os lóbulos pulmonares.

Em indivíduos altamente sensibilizados e suscetíveis, as lesões podem tomar grande parte do parênquima pulmonar, produzindo broncopneumonia difusa, chamada broncopneumonia tuberculosa. Às vezes, não há formação de tubérculos desenvolvidos nessa doença, dificultando a identificação da natureza tuberculosa, porém, o escarro apresenta grande quantidade de bacilos.

- *Tuberculose extrapulmonar*

O *M. tuberculosis* pode acometer outros órgãos quando os bacilos são disseminados pelo organismo, podendo acometer apenas um órgão isoladamente ou mais. Os linfonodos periféricos, trato geniturinário, ossos, fígado e baço, meninges e pele são os órgãos mais comumente atingidos (SAMUELSON, 2000). Os sinais e sintomas clínicos são variados e dependentes do órgão acometido e do estado imunológico do hospedeiro.

- *Tuberculose disseminada ou miliar*

Quando há a disseminação linfo-hematogênica, pode ocorrer o aparecimento de tuberculose miliar. Esta pode limitar-se aos pulmões ou atingir outros órgãos (SAMUELSON, 2000). Os alvos preferidos de disseminação miliar são a medula óssea, o fígado, o baço e a retina, que proporcionam locais para biópsia ou visualização direta da doença.

Na distribuição miliar, as lesões caracterizam-se por apresentarem de um a vários milímetros de diâmetro, com consistência firme e coloração amarelo-esbranquiçada, e geralmente não apresentam caseificação central visível ou cavitação. No entanto, microscopicamente, exibem o padrão de tubérculos individuais ou múltiplos, com caseificação central (RAJA, 2004).

2.1.4. Epidemiologia

No início da década de 90, ressurgiu na mídia e na literatura médica a tuberculose, personagem que há tempos andava fora do panorama epidemiológico (DACOLMO, 2000).

A história da tuberculose data desde as civilizações mais antigas. A doença já foi encontrada em esqueletos de múmias do antigo Egito (3000 a.C.) e, mais recentemente, numa múmia pré-colombiana no Peru. Ao chegar à Europa, a doença disseminou-se com a urbanização e no século XVIII tornou-se conhecida como peste branca. Durante a Revolução Industrial, alcançou índices de mortalidade muito altos (SÃO PAULO, 2005).

Porém, já no século XX, com o desenvolvimento de agentes terapêuticos adequados e eficazes para a época (décadas de 40 a 70) a doença reduziu seus índices de morbidade e mortalidade (SENSI, GRASSI, 1996). Porém, a partir dos anos 80 os casos de tuberculose aumentaram alarmantemente, levando à situação que hoje se depara: aproximadamente 1,9 bilhões de pessoas infectadas no mundo (a população mundial é de aproximadamente 6 bilhões de pessoas), sendo 16 milhões de casos ativos com 1,8 milhões de mortes e 8,2 milhões de novos casos ao ano (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION – PAHO, 2004).

Entre as doenças infecciosas, considerando o panorama mundial, a tuberculose é uma das maiores causadoras de mortes no mundo (BARRY, SLAYDEN, SAMPSON, 2000; WHO, 2004). Atinge principalmente a população economicamente ativa, perfazendo mais de 75% dos casos de tuberculose (GBAYISOMORE *et al.*, 2000). Estima-se que, até o ano 2020, a tuberculose cause 54,7% de mortes entre indivíduos que sofrem de doenças infecciosas nos países em desenvolvimento (SÃO PAULO, 2005).

A Ásia continua sendo o principal continente acometido pela tuberculose. Índia, China e Indonésia ocupam consecutivamente os três primeiros lugares em incidência de tuberculose, totalizando mais de 3,5 milhões de casos novos anualmente (WHO, 2004). O continente americano também constitui um grupo de alta incidência de tuberculose, sendo o Brasil seu principal representante. Segundo dados da Organização Panamericana de Saúde (PAHO, 2004), o Brasil é o primeiro colocado no *ranking* americano em casos de tuberculose, com cerca de 80.000 casos/ano, seguido por Peru (36.000 casos) e México (17.000 casos).

O Brasil ocupa a 15ª colocação no *ranking* mundial por número de casos de TB estimados. No ano de 2003, o país apresentou taxa de incidência de 62 casos por ano para cada 100.000 habitantes, e taxa de prevalência de 92 casos por ano, para cada 100.000 habitantes. Destes, estima-se que cerca de 15.000 morrem de tuberculose anualmente (WHO, 2004). Essas altas taxas devem-se principalmente às baixas condições sócio-econômicas em que a população vive. Paradoxalmente, a maioria dos casos encontra-se principalmente na região sudeste, que possui o maior desenvolvimento do País. Isso pode ser explicado pela alta concentração populacional, onde a grande maioria vive em baixas condições sanitárias. O estado do Rio de Janeiro é o que apresenta a maior incidência de tuberculose, com cerca de 90 casos novos a cada 100.000 habitantes, e a maior taxa de mortalidade, com cerca de 8 mortes para cada 100.000 habitantes anualmente (SÃO PAULO, 2005).

A co-infecção tuberculose/HIV tem sido um dos maiores motivos de preocupação com a doença, sobretudo em países desenvolvidos e na região sub-Saariana da África. Em populações com alta prevalência de infecção pelo vírus HIV, muitas pessoas infectadas com o vírus adquirem tuberculose, e muitos pacientes acometidos pela TB serão infectados pelo HIV. Até o final do ano 2000, cerca de 36,1 milhões de pessoas estavam infectadas pelo HIV, e destes, 25,3 milhões (mais de 70%) encontravam-se na região sub-Saariana. Cerca de 12 milhões destes indivíduos apresentam co-infecção pelo *M. tuberculosis* (WHO, 2004).

Isto ocorre pelo fato de que o HIV invade principalmente os linfócitos T CD4+, células responsáveis pela resposta imunológica à invasão do organismo pelo *M. tuberculosis* (SAMUELSON, 2000). Portanto, indivíduos portadores do HIV, principalmente na fase AIDS, podem apresentar tuberculose por contaminação exógena pelo bacilo ou por recrudescência de infecção anteriormente adquirida, que se encontrava latente (DROBNIEWSKI, POZNIAK, UTTLEY, 1995).

Além de propiciar aumento nos casos de TB, a infecção pelo HIV também chama atenção por colaborar com o aparecimento de micobacterioses oportunistas, como a infecção pelo complexo *M. avium-intracellulare* (HORSBURG, 1999). Embora a infecção por MAC seja incomum em indivíduos normais, pode acometer indivíduos imunodeprimidos, como os portadores do HIV, principalmente na fase

AIDS, quando a contagem de linfócitos cai para menos de $100/\text{mm}^3$ de sangue (SESIN, MANZI, PACHECO, 1996).

Pacientes com AIDS co-infectados por MAC têm redução no tempo de sobrevida, diminuindo-o em 3 a 4 meses. Estudos mostram que o HIV aumenta sua replicação em macrófagos infectados por MAC (ORENSTEIN *et al.*, 1997). Este bacilo também costuma causar enteropatias nos indivíduos que infecta, já que sua principal porta de entrada é o trato gastrintestinal. Com isso, provoca diminuição da absorção dos antimicobacterianos, complicando ainda mais a farmacoterapia da doença e aumentando o aparecimento de resistência, devido à dificuldade de se atingir as concentrações terapêuticas (PELOQUIN, McPHEE, BERNING, 1993).

Outro fator preocupante com relação ao tratamento da tuberculose é o aparecimento de cepas resistentes aos fármacos que compõem a terapia antimicobacteriana. Com isto, muitos estudos têm sido feitos com o intuito de se desenvolver fármacos e pró-fármacos capazes de destruir micobactérias resistentes aos fármacos comumente utilizados (HAEMERS *et al.*, 1990; CYNAMON, KLEMENS, 1992; CYNAMON *et al.*, 1995; RENAU *et al.*, 1996; KLOPMAN *et al.*, 1996; SEITZ, SULING, REYNOLDS, 2002; DIAZ, RUIZ, ROYO, 2003).

Embora a seleção de resistentes seja um processo natural na geração de microrganismos, o fato se acelera pelo uso inadequado dos antimicobacterianos disponíveis, podendo tornar-se um sério problema terapêutico. O *M. tuberculosis* pode apresentar resistência espontânea ou desenvolvê-la por seleção pelos próprios quimioterápicos. Esta última é a principal causa, e ocorre pela prescrição incorreta, falhas posológicas e abandono do tratamento. Em torno de 13% dos pacientes brasileiros com tuberculose abandonam o tratamento (SÃO PAULO, 2005), em grande parte devido ao longo regime terapêutico.

A resistência a um fármaco é dita primária quando o indivíduo é infectado com cepas resistentes. Quando essa resistência é adquirida por uma cepa anteriormente sensível durante a infecção no hospedeiro, é chamada de resistência secundária (SEPKOWITZ, RAFFALLI, RILEY, 1995).

Esquemas terapêuticos inadequados podem inicialmente melhorar o estado clínico do paciente, porém, em longo prazo, podem levar à resistência e, possivelmente, ao aparecimento da tuberculose multi-resistente (TBMR). A TBMR é definida quando o *M. tuberculosis* infectante torna-se resistente a pelo menos dois fármacos, sendo um deles a isoniazida ou rifampicina (SOMMERS & GOOD, 1985; RANDO *et al.*, 2002). Estimativas da OMS (WHO, 2004) indicam que há cerca de meio milhão de casos novos por ano de TBMR no mundo, sendo que aproximadamente metade deles ocorre na China e Índia. Entre os pacientes que foram tratados previamente, a prevalência da TBMR é sete vezes maior que entre os casos novos (WHO, 2004).

Para que se mantenha a efetividade da terapia contra a TBMR, há necessidade que o microrganismo seja mantido sensível à isoniazida ou à rifampicina, sendo estes os antimicobacterianos mais potentes utilizados no tratamento (MITCHISON, 1992). A utilização dos fármacos de segunda escolha para o tratamento da TBMR torna a terapia mais demorada, com taxas de cura menores e de custo mais elevado, já que os fármacos de segunda escolha são cerca de 300 vezes mais caros que os de primeira escolha (WHO, 2004).

Pacientes portadores do HIV possuem risco aumentado de serem infectados por cepas multi-resistentes, risco este que se estende também a pacientes com tuberculose fibrocavária, pacientes nascidos em regiões endêmicas e àqueles hospitalizados em locais com infra-estrutura inadequada (BARNES, BLOCK, DAVIDSON, 1991; RILEY, 1993).

2.2. Controle e Prevenção da Tuberculose

A estratégia mais importante para o controle e a prevenção da tuberculose baseia-se num tripé (RUFFINO-NETO, 2002; WHO, 2004), sendo essas bases: 1. Administração da vacina BCG (bacilo Calmette-Guerín) às crianças; 2. Identificação e quimioprevenção de pessoas com TB não-infecciosa e que vivem em áreas endêmicas, com a finalidade de evitar a transmissão e possível reativação da doença; 3. Identificação e tratamento de indivíduos bacilíferos para evitar a transmissão às pessoas sãs.

2.2.1. Vacina BCG

A vacina BCG é a principal medida profilática para a tuberculose no mundo inteiro. Vem sendo utilizada há mais de 70 anos e possui cobertura mundial de aproximadamente 80%. No Brasil, a aplicação da BCG por via intradérmica é obrigatória para menores de um ano e recomendada para crianças até 4 anos desde 1976, pela Portaria nº 452 de 06/12/1976 do Ministério da Saúde, tendo sido implantada em 1973. As primeiras administrações da BCG no país ocorreram em 1927, por Arlindo de Assis, por via oral (BRASIL, 2002; RUFFINO-NETO, 2002).

O Ministério da Saúde (BRASIL, 2002) recomenda a revacinação em crianças com 10 anos de idade, podendo esta dose ser antecipada para os seis anos. A revacinação não é necessária caso a primeira dose tenha sido aplicada após os 6 anos de idade. Imigrantes que provêm de áreas onde a prevalência de TB mantém-se alta também devem receber a BCG, por recomendação da OMS (2005), com finalidade profilática. Indivíduos que tenham tido reatividade ao teste tuberculínico pós-viagem também devem receber vacinação (COBELENS, DEUTEKOM, DRAAYER-JANSEN, 2000).

A BCG não possui boa atividade em adultos como mostra em crianças e existem grandes controvérsias quanto ao seu uso, já que as taxas de proteção contra a tuberculose variam muito nas diversas regiões onde é utilizada, e os dados sobre a prevenção da TB pulmonar em adultos são inconsistentes (LIFSON, 2000).

2.2.2. Quimioprofilaxia primária

Quimioprofilaxia primária é o nome dado à metodologia de prevenção da tuberculose em indivíduos não infectados, utilizando-se agentes quimioterápicos (PINEDA *et al.*, 2004). O principal fármaco utilizado para a quimioprofilaxia da tuberculose é a isoniazida, recomendado pela *American Thoracic Society* (1971), embora outros fármacos também sejam utilizados atualmente, como a rifampicina e a pirazinamida (PINEDA *et al.*, 2004). Profissionais da saúde, familiares de portadores de TB, portadores de HIV, imigrantes de regiões endêmicas ou outras pessoas que tenham alto risco de contrair a TB devem ser submetidos à quimioprofilaxia (WHO, 2004).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2002) recomenda o uso da isoniazida para a quimioprofilaxia primária em recém nascidos co-habitantes de foco tuberculoso ativo, durante três meses, sendo que decorrido este tempo, deve-se fazer a prova tuberculínica. Se positiva, a quimioprofilaxia deve ser mantida por mais três meses. Se negativo, interrompe-se a administração do fármaco e aplica-se a BCG.

2.2.3. Quimioprofilaxia secundária

A quimioprofilaxia secundária aplica-se a indivíduos menores de 15 anos de idade que não foram vacinados com a BCG e que têm contato com a TB pulmonar bacilífera, sem sinais da doença ativa. Também é indicada para crianças vacinadas, mas que apresentaram reatividade à tuberculina com halo de endurecimento maior que 15 mm (BRASIL, 2002). Sabe-se que a ocorrência de TB nesse grupo é sempre considerada como infecção recente, condição em que a isoniazida mostrou eficácia de 87% (FEREBEE, MOUNT, 1962).

É consenso na literatura que menores de cinco anos, adolescentes e adultos jovens que apresentam teste tuberculínico positivo devem ser orientados a fazer quimioprofilaxia, já que são considerados grupo de alto risco (BRITISH THORACIC SOCIETY, 2000; BRASIL, 2002). Outros grupos também podem ser incluídos, caso tenham contato com pacientes, como indivíduos com AIDS, transplantados,

gestantes, imigrantes de regiões endêmicas, alcoólatras, diabéticos, pacientes com silicose e em quimioterapia (BRASIL, 2002).

Tanto na quimioprofilaxia primária quanto na secundária, o MS preconiza a quimioprofilaxia com isoniazida, na dose de 10mg/kg de peso corpóreo por dia, até a dose máxima de 300mg diárias, durante 6 meses. Em alguns casos, como re-exposição exógena ao *M. tuberculosis*, esse tempo pode ser prolongado (BRASIL, 2002).

2.2.4. Tratamento

A OMS estabeleceu um programa considerado a melhor e mais eficaz forma de evitar ou controlar a disseminação da TB e o surgimento da TBMR: o programa DOTS (*directly observed treatment short-course*). Este programa foi adotado por 182 países e em torno de 77% da população mundial está sendo diagnosticada e tratada pelos métodos propostos por esse programa (WHO, 2004). O programa DOTS mostrou propiciar taxas de sucesso no tratamento da TB acima de 85%, além de ter custos mais baixos que outros esquemas de tratamento.

O programa DOTS baseia-se em cinco elementos, ditos essenciais para o sucesso do programa (WHO, 2004):

- *Comprometimento político sustentável: para aumentar os recursos humanos e financeiros e fazer do controle da TB uma atividade de âmbito nacional e uma parte integral do sistema de saúde da nação.*
- *Acesso à microscopia de escarro de qualidade: para detecção de casos entre pessoas que apresentam sintomas da TB, screening de indivíduos com tosse prolongada por microscopia de escarro e atenção especial para a detecção de casos entre pessoas infectadas pelo HIV e outros grupos de risco.*
- *Padronização da quimioterapia de curto prazo para todos os casos de TB sob condições de monitoramento adequadas: incluindo a observação direta do tratamento. Condições propícias de monitoramento tecnicamente implicam em serviços de tratamento socialmente sustentáveis.*
- *Suprimento ininterrupto de fármacos com qualidade assegurada: com sistemas de obtenção e distribuição confiáveis dos medicamentos.*

- *Sistemas de registro e relatórios possibilitando avaliação externa:* de cada paciente para a avaliação global do desempenho do programa.

Embora o programa DOTS traga altos índices de sucesso no tratamento da TB, alguns países ainda não aderiram e, mesmo nos países em que o programa foi implementado, existem parcelas da população que não tem acesso ao tratamento e monitoramento corretos da doença, o que influencia no controle da mesma (WHO, 2004).

Até a década de 40 do século passado não existia tratamento efetivo e muito menos racional para a TB. Nos primórdios, a terapia absurda baseava-se em ingestão de leite de jumenta ou de sangue de elefante, inalação de esterco de vaca e uso de pele de gatos recém-mortos pelo corpo. Posteriormente, a medida tomada para o tratamento da TB foi isolar os pacientes em sanatórios localizados longe das áreas urbanizadas, onde o ar puro, boa alimentação e repouso constante conseguiam aumentar o tempo de vida, mas mesmo assim, a grande maioria vinha a óbito pelo agravamento da infecção (SILVA & FERREIRA, 1999).

A introdução da estreptomicina na terapia tuberculostática em meados de 1940 trouxe nova esperança no tratamento da TB. Por ter apresentado resultados animadores, logo foi amplamente utilizada, porém, na forma de monoterapia, o que causou o aparecimento rápido da resistência e a doença fugiu ao controle novamente (SILVA & FERREIRA, 1999). Novas pesquisas trouxeram outros fármacos para a terapêutica, como o ácido *p*-aminossalicílico e a isoniazida (considerada até hoje o melhor antimicobacteriano), que propiciaram a mudança da monoterapia para bi ou triploterapia, aumentando a eficiência do tratamento. Com o passar dos anos, outros fármacos foram surgindo: rifampicina, etambutol, pirazinamida, etionamida, ciclosserina, viomicina, tioacetazona e capreomicina, entre outros.

O Ministério da Saúde (BRASIL, 2002) preconizou esquemas de tratamento para as diversas situações: o esquema básico ou esquema I, esquema IR, esquema II, esquema III. Estes devem ser supervisionados e a tomada do medicamento deve ser observada por um profissional da saúde, no local escolhido pelo paciente, ou por

um membro da família devidamente orientado para essa atividade. A supervisão da tomada deve ser feita com pelo menos três observações semanais durante os dois primeiros meses, e uma observação semanal até o final do tratamento. Atenção especial deve ser dada na supervisão de doentes pulmonares bacilíferos que se encontram nas situações de etilismo, retratamento após abandono, mendigos, presidiários e doentes institucionalizados (asilos, manicômios, etc.).

O esquema básico de tratamento, ou esquema I, é indicado para casos novos de TB, pulmonar ou extrapulmonar, exceto para meningite tuberculosa. Entende-se por caso novo o paciente que nunca se submeteu à quimioterapia tuberculostática, que o fez por menos de 30 dias ou há mais de 5 anos. Utiliza-se nesse esquema, rifampicina, isoniazida e pirazinamida, por 2 meses, numa primeira fase, e rifampicina e isoniazida, por 4 meses, numa segunda fase (tabela 1). Os fármacos devem ser administrados preferencialmente em jejum, em uma única tomada. Em casos de evolução insatisfatória ou de TB extrapulmonar, o tempo do tratamento poderá ser prolongado por mais 3 meses na segunda fase.

Tabela 1: Esquema básico (esquema I) para tratamento de casos novos de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar, exceto TB meningocéfálica.

Fases do tratamento (duração)	Fármacos	Peso do paciente			
		Até 20kg	De 20kg até 35kg	De 35kg até 45kg	Mais de 45kg
		mg/kg/dia	mg/dia	mg/dia	mg/dia
Primeira (2 meses)	rifampicina	10	300	450	600
	isoniazida	10	200	300	400
	pirazinamida	35	1000	1500	2000
Segunda (4 meses)	rifampicina	10	300	450	600
	isoniazida	10	200	300	400

O esquema de retratamento, também chamado esquema IR, é indicado em casos de recidiva após a cura ou em casos de retorno após abandono do esquema básico (tabela 2). Pacientes que apresentarem alteração da visão devem ter o uso do etambutol reavaliado.

Tabela 2: Esquema básico + etambutol (esquema IR), para casos de recidiva após cura ou retorno após abandono do esquema I.

Fases do tratamento (duração)	Fármacos	Peso do paciente			
		Até 20kg	De 20kg até 35kg	De 35kg até 45kg	Mais de 45kg
		mg/kg/dia	mg/dia	mg/dia	mg/dia
Primeira (2 meses)	rifampicina	10	300	450	600
	isoniazida	10	200	300	400
	pirazinamida	35	1000	1500	2000
	etambutol	25	600	800	1200
Segunda (4 meses)	rifampicina	10	300	450	600
	isoniazida	10	200	300	400
	etambutol	25	600	800	1200

Em casos de tuberculose meningoencefálica, o esquema II de tratamento deve ser utilizado, mesmo em casos de concomitância com tuberculose em qualquer outro órgão (tabela 3). Nesses casos, a internação é obrigatória e a utilização de corticosteróides (prednisona, dexametasona e outros) é recomendada pelo período de 1 a 4 meses no início do tratamento. Em crianças, a prednisona é administrada na dose de 1 a 2mg/kg de peso corporal, até a dose máxima de 30mg/dia.

Tabela 3: Esquema para tratamento da tuberculose meningoencefálica (esquema II).

Fases do tratamento (duração)	Fármacos	Peso do paciente			
		Até 20kg	De 20kg até 35kg	De 35kg até 45kg	Mais de 45kg
		mg/kg/dia	mg/dia	mg/dia	mg/dia
Primeira (2 meses)	rifampicina	10	300	450	600
	isoniazida	10	200	300	400
	pirazinamida	35	1000	1500	2000
Segunda (7 meses)	rifampicina	10	300	450	600
	isoniazida	10	200	300	400

O esquema utilizado para tratar os casos de falência do esquema básico (esquema I) ou básico reforçado com etambutol (esquema IR) é chamado de esquema III (tabela 4). Entende-se por falência a persistência da positividade do escarro ao final do 4º ou 5º mês de tratamento, tendo havido ou não negativação anterior do exame. São pacientes que, no início do tratamento, eram fortemente positivos e mantiveram essa situação até o 4º mês, ou aqueles com positividade inicial, seguida de negativação e nova positividade por dois meses consecutivos, a partir do 4º mês de tratamento.

A estreptomicina e a etionamida são fármacos incluídos nesse esquema terapêutico. A estreptomicina é administrada por via intramuscular ou, em situações especiais, por via endovenosa. Em pessoas acima de 60 anos de idade, deve ser administrada na dose de 500mg/dia.

Tabela 4: Esquema para falência (esquema III) do esquema I ou IR.

Fases do tratamento (duração)	Fármacos	Peso do Paciente			
		Até 20kg	De 20kg até 35kg	De 35kg até 45kg	Mais de 45kg
		mg/kg/dia	mg/dia	mg/dia	mg/dia
Primeira (3 meses)	Estreptomicina	20	500	1000	1000
	Pirazinamida	35	1000	1500	2000
	Etambutol	25	600	800	1200
	Etionamida	12	250	500	750
Segunda (9 meses)	Etambutol	25	600	800	1200
	Etionamida	12	250	500	750

No caso de falência do esquema III, o paciente deve ser considerado portador de TBMR. Nesses casos, o tratamento da tuberculose é diferenciado e o paciente deve ser encaminhado para unidades de referência capacitadas. Pacientes que apresentam resistência primária à rifampicina, isoniazida e a outros fármacos, geralmente estreptomicina e/ou etambutol, também são agregados a esse grupo. Neste caso, fármacos de segunda escolha como ciclosserina, etionamida, ciprofloxacino, ácido *p*-aminossalicílico, canamicina, capreomicina e tioacetazona são utilizados. Porém, esses fármacos apresentam menor eficiência, maior custo e aumento de efeitos adversos, sendo este último o principal motivo para que os pacientes descontinuem o tratamento (ROUHI, 1999).

Quando há aderência total do paciente com tuberculose ao regime terapêutico, a doença pode ser curável em 100% dos casos novos (BRASIL, 2002). Mesmo em casos da doença mais avançados, as taxas de cura são excelentes.

2.3. Fármacos Antimicobacterianos

Os fármacos disponíveis para o tratamento da tuberculose foram descobertos em um período de duas décadas (1944-1965), durante o qual houve uma procura relativamente intensa por laboratórios de indústrias e laboratórios ligados às indústrias. Entretanto, desde a descoberta da rifampicina em 1965, nenhum outro antimicobacteriano importante foi desenvolvido (SILVA & FERREIRA, 1999). Alguns estudos recentes tentam introduzir novos quimioterápicos no tratamento da tuberculose, porém, ainda não foram introduzidos na terapêutica (TOMIOKA *et al.*, 2000; RANDO *et al.*, 2002; SEITZ, SULING, REYNOLDS, 2002; DIAZ, RUIZ, ROYO, 2003).

Grande parte dos agentes antimicobacterianos, utilizados nos esquemas terapêuticos padronizados, surgiu principalmente por triagem empírica de compostos sintéticos ou de origem microbiana, e por modificações moleculares de candidatos a fármaco (SENSI & GRASSI, 1996).

2.3.1. Isoniazida

A isoniazida (figura 3), hidrazida do ácido nicotínico, é o principal e mais potente antimicobacteriano na terapêutica. É um antibacteriano sintético com ação bactericida contra o *M. tuberculosis*. O fármaco foi descoberto em 1952, como um fármaco de uso oral, efetivo contra o bacilo em infecções intra e extramacrofágicas (LEMKE, 2002). A isoniazida possui atividade bactericida principalmente contra microrganismos em replicação, e parece ser apenas bacteriostática contra aqueles em fase de latência. Como o *M. tuberculosis* mostra diminuição de seus ácidos graxos presentes em sua parede celular, pode-se deduzir que a isoniazida tem seu mecanismo de ação na interferência com a formação da parede celular.

Figura 3: Isoniazida.

A isoniazida foi descoberta por FOX & GIBAS (1952), durante a síntese de tiossemicarbazonas, quando notaram que as reações foram afetadas por uma modificação no protocolo da síntese e se depararam com um intermediário isonicotinilidrazínico (isoniazida), que foi ensaiado e apresentou resultados superiores aos da estreptomicina, melhor antimicobacteriano até então.

O mecanismo de ação da isoniazida era desconhecido até recentemente. Com base em estudos sobre os mecanismos de resistência, foi proposto que a isoniazida é uma forma latente que é ativada por oxidação catalisada por uma catalase-peroxidase endógena, katG (LEMKE, 2002). Da reação entre a isoniazida e a enzima resultam produtos como isonicotinaldeído, ácido isonicotínico e isonicotinamida, formados por intermediários reativos como radical isonicotinoíla e ácido perisonicotínico (figura 4).

Figura 4: Produtos formados na reação da isoniazida com a catalase-peroxidase micobacteriana (LEMKE, 2002).

Esses produtos são espécies reativas capazes de acilar um sistema enzimático encontrado exclusivamente no *M. tuberculosis*, em que a principal

enzima é uma enoil redutase NADH-dependente chamada inhA, que regula a síntese dos ácidos micólicos, mais especificamente de ácidos graxos de cadeia longa (maior que 26 carbonos). As espécies reativas da isoniazida acilam a posição 4 do NADH, impedindo a síntese de ácidos micólicos (GEORGIEVA & GADJEVA, 2002).

A isoniazida é rapidamente absorvida pela administração oral, que pode ser alterada pela alimentação concomitante ou uso de antiácidos (principalmente hidróxido de alumínio), sendo, portanto, recomendada a administração em jejum (LEMKE, 2002). O fármaco é amplamente distribuído pelos tecidos, inclusive pelos infectados (MANDELL & PETRI-JR, 1996). O uso prolongado da isoniazida mostra alta incidência de hepatotoxicidade, portanto, etilistas e portadores de hepatopatias devem ser clinicamente monitorados (SNIDER, 1980). A hepatotoxicidade parece aumentar com a idade, e parece mais intensa em mulheres que em homens.

- *Relação entre estrutura química e atividade biológica (REA)*

Séries de derivados do nicotinaldeído, isonicotinaldeído e hidrazidas do ácido isonicotínico substituído foram sintetizados e avaliados quanto sua atividade tuberculostática (LEMKE, 2002). Algumas relações entre a estrutura química e a atividade biológica foram propostas:

- (1) As hidrazonas da isoniazida possuem atividade, porém, são instáveis no trato gastrointestinal, liberando a isoniazida livre, o que sugere que a atividade provém da isoniazida e não dos derivados;
- (2) A substituição da porção hidrazínica com substituintes alifáticos e/ou aromáticos resulta em derivados inativos;
- (3) Modificações na posição N2 da hidrazida resultam em compostos ativos, porém, menos ativos que a isoniazida;
- (4) Modificações na posição N1 da hidrazida com alquilas resultam em compostos inativos;
- (5) A mudança da hidrazida para as posições 2 ou 3 do anel diminui a atividade;
- (6) A mudança da hidrazida para derivados, como ácido hidroxâmico e amida resultam em inatividade.

2.3.2. Rifamicinas

As rifamicinas são membros da classe das ansamicinas de produtos naturais isolados do *Streptomyces mediterranei* (MANDELL & PETRI-JR, 1996). Esta classe é caracterizada por moléculas com uma cadeia alifática interligando duas posições não-adjacentes de uma porção aromática (ponte ansa) (LEMKE, 2002). A rifampicina (figura 5) e a rifapentina são derivados semi-sintéticos das rifamicinas, preparados por conversão destas a 3-formilrifamicina e derivatizada com hidrazinas. São ativas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e possuem alta eficiência clínica no tratamento da tuberculose. A rifampicina, juntamente com a isoniazida, são os principais antimicobacterianos na terapêutica. Após a introdução da rifampicina na terapia da TB, em 1967, o tempo do tratamento com a terapia combinada com outros fármacos foi reduzido pela metade, o que mostra sua importância como antimicobacteriano.

Figura 5: Rifampicina.

As rifamicinas inibem a RNA polimerase dependente de DNA (RPDD), uma metaloprotease, ligando-se a subunidade β da enzima. Por isso, tornam-se altamente ativas contra bacilos em rápida divisão, tanto intra quanto extracelularmente. A inibição da RPDD leva ao bloqueio da iniciação da formação da cadeia de RNA. Foi proposto que o anel naftalênico das rifamicinas faz interações π - π com um anel aromático de um aminoácido da RPDD (ARORA, 1985). Também foi postulado que os oxigênios em C1 e C8 podem quelar-se ao átomo de zinco da RPDD, e os oxigênios do C21 e C23 fazem interações de hidrogênio com a enzima, aumentando a força de ligação a esta. A rifampicina, especificamente, inibe o alongamento das transcrições, mas apresenta pouca atividade na iniciação da transcrição (BLANCHARD, 1996).

A rifampicina é rapidamente absorvida pelo intestino embora alimentos interfiram na absorção, devendo ser, portanto, administrada em jejum. A absorção de outros antimicobacterianos parece não ser afetada pela rifampicina, mas alguns relatos mostraram que a isoniazida afeta a absorção da rifampicina (MANDELL & PETRI-JR, 1996). O fármaco é potencialmente hepatotóxico, e pode causar efeitos gastrintestinais, *rash* e púrpura trombocitopênica. O principal metabólito da rifampicina é a desacetil-rifampicina, ainda ativo, encontrado nas fezes, e seu glicuronídeo, na urina. O fármaco também é indutor enzimático, principalmente sobre as isoformas CYP3A4 e CYP2C, reduzindo assim a ação de alguns fármacos, como contraceptivos orais, corticosteróides, varfarina, quinidina, metadona, zidovudina, claritromicina e antifúngicos azólicos (LEMKE, 2002).

- *REA*

- (1) Grupamentos hidroxila são essenciais para a atividade nas posições 1, 8, 21 e 23, devendo ser coplanares;
- (2) A acetilação das hidroxilas nas posições 21 e 23 geram compostos inativos;
- (3) A redução das duplas ligações na ponte ansa resulta em diminuição da atividade;
- (4) A abertura da ponte ansa resulta em compostos inativos;
- (5) As substituições nos carbonos 3 e 4 resultam em compostos com atividade variável, por afetar o transporte através da parede celular.

Outro fármaco pertencente a esta classe, introduzido mais recentemente na terapia tuberculostática é a rifapentina (figura 6), utilizada principalmente na TB pulmonar (LEMKE, 2002). A rifapentina é considerada vantajosa frente à rifampicina já que, quando utilizada na terapia combinada, pode ser administrada duas vezes por semana, oralmente, no início da terapia e, após, uma vez por semana.

Figura 6: Rifapentina.

2.3.3. Pirazinamida

A pirazinamida (figura 7) foi descoberta durante investigações de análogos da nicotinamida. Ela é um bioisóstero da nicotinamida, ou seja, assemelha-se a este metabólito. Possui ação antimicobacteriana contra o *M. tuberculosis*, por isso, tornou-se um dos fármacos mais utilizados na terapia da TB, mas a resistência desenvolve-se rapidamente, sendo recomendada, portanto, a terapia combinada, por reduzir essa possibilidade. A atividade da pirazinamida parece ser dependente do pH com boa atividade *in vivo* a pH 5,5, mas o composto é facilmente inativado em pH neutro (LEMKE, 2002).

Figura 7: Pirazinamida.

A pirazinamida é utilizada na primeira fase do tratamento, quando a infecção encontra-se ainda como granulomatosa, pelo fato deste fármaco atravessar bem a membrana do macrófago e atuar muito bem em pH ácido (em torno de 5,5). A importância da pirazinamida reside, então, na sua capacidade de destruir bacilos no interior dos macrófagos, complementando a ação da isoniazida e da rifampicina (DOLEZAL *et al.*, 2002).

O fármaco é facilmente absorvido após administração oral e uma pequena fração é eliminada inalterada na urina (LEMKE, 2002). A maior rota metabólica consiste de hidrólise por pirazinamidases, enzimas microssomais hepáticas, resultando no ácido pirazinóico, que pode, então, ser oxidado pela enzima xantina oxidase a ácido 5-hidroxipirazinóico, que por sua vez pode aparecer na urina livremente ou conjugado com glicina. A pirazinamida tem meia-vida de eliminação de 10 a 16 horas (MANDELL & PETRI-JR, 1996).

O mecanismo de ação da pirazinamida é desconhecido. Uma hipótese proposta por CYNAMON e cols. (1992) é que a pirazinamida pode ser totalmente ou parcialmente ativa como um fármaco. A pirazinamida é ativa apenas no pH ácido do ambiente intramacrofágico, mas não é ativada simplesmente pelo pH. Este ambiente pode induzir componentes bacterianos que ativam a pirazinamida, provavelmente uma amidase específica, a pirazinamidase. Organismos suscetíveis produzem pirazinamidase, que é responsável pela conversão a ácido pirazinóico. Cepas resistentes do *M. tuberculosis* não produzem esta amidase, devido a mutações no gene associado (*pncA*), sugerindo que a forma ácida do fármaco é a forma ativa. A pirazinamida seria um pró-fármaco do ácido pirazinóico, que se acredita ser o agente ativo contra o *M. tuberculosis* (CYNAMON & KLEMENS, 1992; CYNAMON *et al.*, 1995; DOLEZAL *et al.*, 2002).

- **REA**

- (1) A substituição isostérica do anel pirazínico resulta em compostos de menor atividade;
- (2) A substituição do hidrogênio na posição 5 do anel por átomos de F ou Cl resultam em compostos mais ativos.

O ácido pirazinóico (figura 8) apresenta atividade biológica em pH 5,4 ou menor, mas testes *in vitro* mostraram que é 8-16 vezes menos ativo que pirazinamida, provavelmente por ter menor penetração pela parede celular bacteriana (CYNAMON *et al.*, 1995). O ácido pirazinóico pode abaixar o pH na circunvizinhança imediata do *M. tuberculosis* numa extensão em que o organismo é

incapaz de crescer (LEMKE, 2002). Essas propriedades físico-químicas parecem contribuir com apenas uma parte da atividade.

Figura 8: Ácido pirazinóico (1) e pró-fármacos ésteres (1a).

Um possível mecanismo de ação para o ácido pirazinóico, proposto por ZIMHONY e cols. (2000), é a inibição da ácido graxo sintetase I (FAS-I), enzima responsável pela síntese e alongamento dos ácidos micólicos da parede celular micobacteriana. Esta enzima é responsável por gerar ácidos graxos com 16 carbonos a partir de acetil-coenzima A, e alongá-los até 24 a 26 carbonos (KIKUCHI, RAINWATER, KOLATTUKUDY, 1992). A isoforma II (FAS-II) é responsável pelo alongamento da cadeia dos produtos da FAS-I até 74 a 90 carbonos (KOLATTUKUDY *et al.*, 1997; COLE *et al.*, 1998).

Verificou-se que derivados ésteres do ácido pirazinóico (figura 8) podem evitar o mecanismo de resistência, por serem ativados por esterases microbianas, liberando o ácido pirazinóico mesmo em formas clinicamente resistentes do *M. tuberculosis* que não são sensíveis a pirazinamida pela perda da atividade da amidase devido à mutação do gene associado (SOLOMONS & SPOERRI, 1953; CYNAMON & KLEMENS, 1992; CYNAMON *et al.*, 1995; DOLEZAL *et al.*, 2002; SEITZ, SULING, REYNOLDS, 2002).

Desta maneira, vários derivados ésteres do ácido pirazinóico mostraram atividade significativa contra cepas de *M. tuberculosis* suscetíveis e resistentes a pirazinamida, tais como *M. bovis*, *M. kansasii* e *M. avium* (CYNAMON & KLEMENS, 1992; CYNAMON *et al.*, 1995; SEITZ, SULING, REYNOLDS, 2002). Os derivados ésteres do ácido pirazinóico são tidos então como pró-fármacos potenciais, os quais liberarão *in vivo* o composto ativo (SEITZ, SULING, REYNOLDS, 2002).

2.3.4. Etambutol

O etambutol (figura 9), quimicamente o etilenodiiminobutanol, é um fármaco amplamente utilizado na terapia da TB (MANDELL & PETRI-JR, 1996; LEMKE, 2002). O etambutol apresenta centros assimétricos, sendo que o enantiômero (+) é 200 a 500 vezes mais ativo que o enantiômero (-) (REYNOLDS *et al.*, 1999). Este fato indica que, provavelmente, o etambutol tenha um receptor específico em seu local de ação.

Figura 9: Etambutol.

Embora tenha baixa solubilidade em água, é rapidamente absorvido após administração oral. A maior parte do fármaco administrado é eliminado de forma inalterada (cerca de 73%), e o restante é eliminado por via urinária através de metabólitos nas formas de aldeído e ácido carboxílico, ambos inativos (LEMKE, 2002).

O mecanismo de ação do etambutol, a exemplo da pirazinamida, também continua em investigação, embora haja uma série de achados que sugerem um local de ação específico. Sabe-se que o etambutol inibe a síntese da parede celular da micobactéria, porém, devido à alta complexidade desta, ainda não se conseguiu pontuar o local de ação. TAKAYAMA & KILBURN (1989) sugeriu que o fármaco inibia a síntese da porção constituída de arabinofuranose e galactose, e, recentemente, relatou-se que o etambutol inibe a enzima arabinosil transferase, que catalisa a polimerização da arabinofuranose, levando à formação da porção anteriormente citada (LEE *et al.*, 1995). A resistência se dá então pela superexpressão do gene da arabinosil transferase (*embAB*) (BELANGER *et al.*, 1996).

- REA

- (1) A homologia da cadeia etilênica leva a compostos sem atividade;
- (2) A substituição dos nitrogênios leva à redução da atividade;
- (3) O aumento dos substituintes ligados aos nitrogênios também gera moléculas inativas ou menos ativas;
- (4) A mudança da posição das hidroxilas reduz drasticamente a atividade.

2.3.5. Estreptomicina

A estreptomicina (figura 10) foi o primeiro fármaco clinicamente eficaz a tornar-se disponível para o tratamento da tuberculose. Foi isolada primeiramente por Waksman e cols. em 1944 (LEMKE, 2002), de uma amostra de solo adubado com esterco, contendo *Streptomyces griseus*, e representa o primeiro aminoglicosídeo biologicamente ativo, sendo sua estrutura determinada por Folkers e cols. em 1948 (LEMKE, 2002). A princípio, a estreptomicina mostrou-se ideal para o tratamento de todas as formas da tuberculose, e por isso foi utilizada em doses altas. Porém, devido à alta toxicidade e o aparecimento de microrganismos resistentes, sua utilidade foi limitada. O surgimento da terapia combinada recolocou a estreptomicina na quimioterapia da TB, mas dentre os fármacos de primeira escolha, é o menos utilizado (MANDELL & PETRI-JR, 1996).

Figura 10: Estreptomicina.

O mecanismo de ação da estreptomicina, embora não completamente elucidado, baseia-se na ligação com a subunidade direcional 30S, constituído por 21 proteínas e uma molécula de RNA 16S. A estreptomicina liga-se com 3 dessas proteínas, e possivelmente, com o RNA ribossômico 16S (FINKEN *et al.*, 1993).

Essa ligação, além de modificar a síntese de proteínas necessárias à micobactéria, induz a formação de proteínas anômalas.

A estreptomicina é altamente hidrofílica, gerando assim uma baixa absorção pelo trato gastrointestinal. Quando assim administrada, a maior parte do fármaco é encontrada inalterada nas fezes (MANDELL & PETRI-JR, 1996). Por esse motivo, é comumente administrada por via intramuscular. Em torno de 55% da dose é encontrada na urina de forma inalterada, após a administração por via intramuscular, sendo que seus metabólitos ainda não foram isolados.

A metabolização da estreptomicina parece ser o principal mecanismo de resistência micobacteriana. As cepas resistentes adquirem essa característica por mutação (FINKEN *et al.*, 1993), mas o processo de resistência se dá principalmente por seleção de cepas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Foram propostos dois mecanismos de resistência: o primeiro mecanismo consiste na transformação do fármaco em uma forma O-3-adenilada, pela enzima adenililtransferase, enquanto o segundo mecanismo consiste na transformação em um metabólito O-3-fosforilado pela catálise com fosfotransferase. Ambos metabólitos não se ligam aos ribossomos (LEMKE, 2002).

2.3.6. Etionamida

A etionamida (figura 11) surgiu da pesquisa de análogos da isoniazida, em busca de novos antimicobacterianos. A etionamida exibe atividade bactericida tanto em cepas de *M. tuberculosis* como em cepas de *M. leprae* (LEMKE, 2002). É considerada um fármaco de segunda escolha no tratamento da tuberculose por não ser bem tolerada após administração oral, por causar irritação da mucosa do trato gastrointestinal. Portanto, é indicada somente associada a outros antimicobacterianos quando o tratamento com os fármacos de primeira escolha é ineficaz ou contra-indicado (MANDELL & PETRI-JR, 1996).

Figura 11: Etionamida.

O mecanismo de ação proposto para a etionamida baseia-se em evidências que sugerem o mesmo local de ação da isoniazida. Similarmente a esta, a etionamida é considerada um bioprecursor de sua forma ativa, etionamida sulfóxido (BAULARD *et al.*, 2000), por meio de oxidação catalisada pela catalase-peroxidase. A forma ativa é um agente acilante, que inativa a enzima inhA enoil redutase, acilando a cisteína 243 da enzima (figura 12) (LEMKE, 2002).

Figura 12: Mecanismo de ação da etionamida (adaptado de LEMKE, 2002).

A etionamida é absorvida por via oral, embora deva ser administrada junto com alimentos para reduzir a irritação gastrointestinal que causa. Distribui-se rápida e amplamente pelo organismo, atingindo concentrações significativas no líquido. É eliminada principalmente por via urinária, com menos de 1% excretado na forma inalterada (LEMKE, 2002; MANDELL & PETRI-JR, 1996). Entre os metabólitos eliminados, destacam-se a etionamida sulfóxido, 2-etil-isonicotinamida e compostos *N*-metilados.

Entre as reações adversas mais comuns devidas ao uso da etionamida, citam-se a anorexia, náuseas e vômitos, embora possam ocorrer também hipotensão postural, depressão, sonolência e astenia. Pode causar hepatite, observada em 5% dos casos, mas que desaparece com a interrupção do tratamento (SIMON, VERES, BANKI, 1969).

2.3.7. Ácido *p*-aminossalicílico (PAS)

O PAS (figura 13) também é um fármaco de segunda escolha no tratamento da tuberculose, embora já tenha sido bastante usado antes do desenvolvimento dos fármacos mais recentes. Esse fato causou o aparecimento de cepas resistentes, que combinado com seus efeitos adversos graves reduziu sua importância na terapia tuberculostática (LEMKE, 2002). É um bacteriostático usado em grandes doses (cerca de 12g por dia), causando irritação gastrointestinal e também, reações de hipersensibilidade em 5 a 10% dos pacientes (MANDELL & PETRI-JR, 1996).

Figura 13: Ácido *p*-aminossalicílico.

O mecanismo de ação do PAS baseia-se na semelhança com o ácido *p*-aminobenzóico, sendo que o fármaco atua como antimetabólito na síntese de folatos essenciais para a micobactéria. Este mecanismo é muito semelhante ao das sulfonamidas, porém, curiosamente, as sulfonamidas não exibem atividade contra micobactérias, e o PAS não é ativo contra microrganismos sensíveis às sulfonamidas (MANDELL & PETRI-JR, 1996). Portanto, é provável que as enzimas responsáveis pela biossíntese de folatos em muitos microrganismos sejam capazes de diferenciar vários análogos do metabólito verdadeiro.

A administração de PAS concomitantemente com isoniazida parece reduzir a acetilação da isoniazida, elevando os níveis séricos da isoniazida. Esse mecanismo pode ter importância clínica, especialmente em indivíduos acetiladores rápidos.

2.3.8. Cicloserina

A cicloserina (figura 14) é um antibiótico de amplo espectro. Foi isolada primeiramente de produtos de *Streptomyces orchidaceus* em 1955, sendo o enantiômero D-(+) a forma ativa, atualmente sintetizada. É utilizada em associação com outros antimicobacterianos na terapia da tuberculose pulmonar e extrapulmonar, quando os fármacos de primeira escolha falham. É estável em soluções alcalinas, mas rapidamente degradada em pH neutro ou ácido, formando produtos diméricos (JENSEN *et al.*, 1980).

Figura 14: Cicloserina.

A ação da cicloserina é associada à sua capacidade de inibir duas enzimas, a D-alanina racemase e a D-alanina ligase, impedindo a formação da parede celular micobacteriana, já que a D-alanina é um componente importante dos peptideoglicanos. A cicloserina é um análogo rígido da D-alanina, inibindo competitivamente essas duas enzimas e sendo incorporada no peptideoglicano da parede (MANDELL & PETRI-JR, 1996; LEMKE, 2002). A D-alanina racemase está particularmente envolvida na isomerização da L-alanina em D-alanina, que é a forma utilizada na síntese da parede celular. A D-alanina ligase faz a ligação D-alanina-D-alanina, que é incorporada à parede micobacteriana.

Quando administrada oralmente, a cicloserina é rapidamente absorvida, distribuindo-se por todos os tecidos corporais. Embora seja um fármaco hidrofílico, as concentrações da cicloserina no líquido são aproximadamente iguais às atingidas no plasma. Em torno de 65% de uma dose administrada parenteralmente são eliminados na forma inalterada na urina, sendo muito pouco metabolizada (MANDELL & PETRI-JR, 1996).

Os principais efeitos adversos da cicloserina são principalmente de origem central, e por isso tem sido estudada a possibilidade de utilizá-la na terapia da

doença de Alzheimer (THOMPSON, MOSKAL, DISTERHOFT, 1992). O fármaco tem a capacidade de se ligar aos receptores neuronais do tipo N-metilaspártato (NMDA) e também afeta a síntese e metabolismo do ácido γ -aminobutírico (GABA), levando à sonolência, cefaléia, tremores, vertigem, confusão, nervosismo, estados psicóticos com tendência suicida, crises convulsivas tônico-clônicas ou de ausência (MANDELL & PETRI-JR, 1996). Em geral, esses efeitos desaparecem com a suspensão do uso.

2.3.9. Fluorquinolonas

As quinolonas (figura 15) são antibacterianos obtidos por síntese, caracterizadas por um anel 3-carboxipirido-4-ona N-1-alquilado, fundido a outro anel aromático. A primeira quinolona, o ácido nalidíxico, começou a ser comercializada em 1965 (MITSCHER, 2002) e foi descoberta por LESHER e cols. em 1962 (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Figura 15: Estrutura geral das quinolonas.

As primeiras quinolonas possuem espectro de ação reduzido, sendo eficaz somente contra bactérias Gram-negativas. Possuem alta taxa de ligação às proteínas plasmáticas e, portanto, são eficazes somente em infecções que ocorrem em compartimentos em que o fármaco encontra-se desligado, como o trato urinário (MITSCHER, 2002). Por esses motivos, seus usos se restringem a infecções urinárias (causadas principalmente por *Escherichia coli*). A modificação molecular das quinolonas levou ao aumento do espectro de ação, proporcionando atividade aprimorada contra bactérias Gram-positivas, e à melhoria das propriedades farmacocinéticas, possibilitando o uso terapêutico em vários outros tipos de infecções.

O mecanismo de ação antibacteriano é comum a todas as quinolonas. Esses fármacos são bactericidas por inibirem a DNA girase e a topoisomerase IV (LEMKE, 2002; MITSCHER, 2002). Estas enzimas são responsáveis pela conformação do DNA, alterando sua conformação por catalisar a clivagem da fita circular do DNA bacteriano, passando a fita não-clivada por essa abertura e ligando a parte clivada novamente, levando a formação de uma espiral. A inibição destas enzimas torna a leitura do DNA inacessível, impossibilitando que este seja replicado, reparado e transcrito, e levando à morte bacteriana.

As quinolonas inibem essas enzimas em razões diferentes, sendo que a inibição da topoisomerase IV leva à atividade em Gram-positivos, e a inibição da DNA girase, contra Gram-negativos. A toxicidade seletiva é explicada pelo fato de que humanos possuem topoisomerase II, que não se liga às quinolonas (MITSCHER, 2002). A resistência às quinolonas tem se tornado cada vez mais freqüente, e ocorre por inibição da captura do antibacteriano pela célula, ou por mutação que leva ao aparecimento de enzimas menos sensíveis.

As quinolonas são bem absorvidas após administração oral (MANDELL & PETRI-JR, 1996). A administração concomitante com metais polivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} e Fe^{2+}) reduz a absorção das quinolonas, já que estas são capazes de quelar estes, produzindo complexos menos solúveis. Portanto, a co-administração de antiácidos, hematínicos, tônicos e alimentos, que contém esses metais, é contraindicada (MITSCHER, 2002). Distribuem-se amplamente pelo organismo, apresentando um volume de distribuição bastante elevado, observando-se concentrações na urina, rim, pulmão, fezes, bile, macrófagos e neutrófilos maiores que as concentrações plasmáticas. As vias de eliminação desses fármacos variam, sendo que alguns são eliminados principalmente por depuração renal (ofloxacino, lomefloxacino e cinoxacino) e outros principalmente por vias não-renais (perfloxacino) (MANDELL & PETRI-JR, 1996).

Os principais efeitos adversos das quinolonas consistem em atividade pró-convulsivante, especialmente em indivíduos portadores de epilepsia (MITSCHER, 2002), sendo outros efeitos centrais menos comuns, como alucinações, insônia e distúrbios visuais. Seu uso deve ser evitado no primeiro trimestre de gestação, pela

possibilidade de causar acidose metabólica e anemia hemolítica. As fluorquinolonas geralmente são mais bem toleradas.

As fluorquinolonas (fármacos a partir da segunda geração) têm sido amplamente estudadas como agentes que podem potencialmente ser usados na terapia antimicobacteriana, especialmente da tuberculose e de outras micobacterioses (como a causada pelo MAC), por atuarem atividade em baixas concentrações, concentrar-se em macrófagos e possuir baixa frequência de efeitos adversos (LEMKE, 2002). Estes fármacos apresentam em sua estrutura um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico (figura 15), e apresentam atividade contra *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, complexo *M. avium-intracellulare* e *M. leprae* (FRANZBLAU & WHITE, 1990; HAEMERS *et al.*, 1990; RENAULT *et al.*, 1995; KLOPMAN *et al.*, 1996; RENAULT *et al.*, 1996; KAWAKAMI *et al.*, 2000).

A utilização das fluorquinolonas na terapia antimicobacteriana predomina sobre pacientes infectados por TBMR e na infecção por MAC, já que nestas a utilização dos fármacos de primeira escolha, principalmente a isoniazida e pirazinamida, torna-se ineficaz (LEMKE, 2002). Entre as principais fluorquinolonas antimicobacterianas, destacam-se o ciprofloxacino, ofloxacino, levofloxacino e esparfloxacino, sendo que o moxifloxacino também tem sido avaliado de maneira muito promissora (figura 16) (HAEMERS *et al.*, 1990; RENAULT *et al.*, 1995; RENAULT *et al.*, 1996; KAWAKAMI *et al.*, 2000; LEMKE, 2002).

Figura 16: Principais quinolonas antimicobacterianas. (a) ciprofloxacino; (b) esparfloxacino; (c) ofloxacino (levofloxacino); (d) moxifloxacino.

- REA (KLOPMAN *et al.*, 1996; RENAULT *et al.*, 1996; LEMKE, 2002)
 - (1) A presença do átomo de flúor na posição 6 é necessária para a atividade antimicobacteriana;
 - (2) A presença do átomo de flúor ou metoxila na posição 8 aumenta a atividade, porém, não é essencial;
 - (3) Substituintes ciclopropila e *t*-butila em N-1 aumentam a atividade antimicobacteriana
 - (4) O aumento da lipofilicidade do substituinte em N-1 diminui a atividade;
 - (5) É necessária a substituição na posição 7 com um heterociclo, sendo piperazinas e pirrolidinas os melhores, porém, as pirrolidinas são mais citotóxicas;
 - (6) O aumento da cadeia alquílica no heterociclo da posição 7 reduz a atividade antimicobacteriana.

2.4. Desenvolvimento de fármacos

O desenvolvimento de fármacos, principalmente quimioterápicos, torna-se necessário já que é comum o aparecimento de resistência dos agentes patogênicos aos fármacos disponíveis. Particularmente, os fármacos antimicobacterianos passam por um período de interesse de inúmeros pesquisadores, porém, nenhum fármaco ou pró-fármaco novo foi introduzido na terapia da doença.

Nos tempos mais remotos, o ser humano utilizou-se de plantas e seus extratos para o tratamento de enfermidades diversas. Esse conhecimento, passado de geração para geração, levou ao isolamento e desenvolvimento de inúmeros fármacos presentes ainda hoje na terapêutica. A extração de fontes naturais é um método ainda bastante utilizado para a descoberta de novos fármacos, porém, a complexidade estrutural das moléculas encontradas nessas fontes muitas vezes inviabiliza a sua utilização terapêutica, já que a síntese se torna difícil e as quantidades obtidas nas extrações são, em sua maioria, muito pequenas (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Além das fontes naturais, muitos fármacos foram descobertos ao acaso, por observação de seus efeitos indesejáveis. Alguns exemplos clássicos de fármacos encontrados na terapêutica que foram descobertos dessa maneira são as sulfonamidas antibacterianas (descoberta a partir de uma forma latente, o *prontosil rubrum*), as sulfoniluréias hipoglicemiantes (advindas das sulfonamidas, pela observação de seus efeitos adversos), os benzodiazepínicos (que foi descoberto na busca de agentes antidepressivos) e a acetanilida como antipirético (utilizada anteriormente como antiparasitário, e levou à descoberta do paracetamol ou acetaminofeno) (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Muitos são os métodos utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo os métodos de modificação molecular os mais amplamente empregados (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). O método baseia-se na modificação de grupos funcionais presentes em uma molécula ou fármaco protótipo, objetivando-se melhorar as características farmacêuticas (alterando a solubilidade das moléculas nos fluidos biológicos, propriedades físico-químicas, sabor), farmacocinéticas

(otimizando a absorção, distribuição, metabolização e eliminação do fármaco no organismo vivo) ou farmacodinâmicas (melhorando a ligação do fármaco com seu alvo).

2.4.1. Latenciação de fármacos

A partir de um protótipo de estrutura química e ação biológica conhecidas, pode-se chegar à síntese de compostos com atividade aprimorada ou modificada. Nesta linha, latenciar constitui recurso da modificação molecular, onde se faz derivatizações químicas biorreversíveis de fármacos a fim de se obter os denominados fármacos latentes (WERMUTH, 1996).

Classicamente, a latenciação consiste na transformação química de um fármaco a uma forma de transporte inativa que, *in vivo*, libera o fármaco através de transformação química ou enzimática. Entre os objetivos da latenciação, citam-se a possibilidade de aumentar a biodisponibilidade do fármaco (por exemplo, pró-fármacos de catecolaminas), prolongar sua ação (pró-fármacos poliméricos), reduzir a toxicidade (pró-fármacos de antiinflamatórios não-esteróides), aumentar seletividade de ação (utilizando-se substratos enzimáticos como transportadores) e também resolver problemas de formulação (como o palmitato de cloranfenicol) (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988; BUNDGAARD, 1991; CHUNG & FERREIRA, 1999). As formas latentes podem ser classificadas como pró-fármacos clássicos, bioprecusores e fármacos dirigidos (WERMUTH, 1996).

Os pró-fármacos clássicos são obtidos através da ligação de um fármaco com uma molécula transportadora, de forma que possa posteriormente ser liberado (WERMUTH, 1996). Por definição, são formas de transporte inativas que, por meio de ligações hidrolisáveis *in vivo* (por exemplo, ligações éster e amida), liberam o fármaco ativo no local de ação ou próximo deste (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). Inúmeros exemplos de pró-fármacos clássicos são encontrados na literatura, sendo ainda hoje um dos principais métodos de planejamento de formas latentes para muitas patologias, sendo a terapia das doenças infecciosas o principal objetivo. É desejável que o grupo transportador,

após a liberação, não possua atividade de importância farmacológica ou toxicológica, ou seja, deve ser inativo.

No caso do transportador também possuir atividade farmacológica, pode-se denominar esse pró-fármaco de pró-fármaco recíproco ou mútuo. Este tipo de forma latente tem como objetivo liberar *in vivo* os fármacos ativos, onde cada um irá exercer sua atividade, segundo seu mecanismo (WERMUTH, 1984; BUNDGAARD, 1991). A ligação entre os dois fármacos pode ser feita diretamente, ou utilizando-se para tal uma molécula espaçante, que, semelhantemente a qualquer transportador, deve ser farmacologicamente inativa. É importante que o tipo de ligação entre esses fármacos também seja hidrolisável química ou enzimaticamente no organismo vivo, caso contrário, deixa de ser um pró-fármaco e passa a ser um fármaco híbrido.

Entre as vantagens que um pró-fármaco mútuo apresenta frente a uma simples associação farmacêutica, estão (MENDER & ROURK, 1997):

- a) o pró-fármaco recíproco é melhor absorvido, devido ao mascaramento de grupos polares envolvidos na ligação entre os fármacos;
- b) os dois fármacos são liberados concomitantemente e, conseqüentemente, a biodisponibilidade será semelhante;
- c) o efeito máximo da combinação dos dois fármacos ocorre ao mesmo tempo;
- d) a distribuição dos dois fármacos, enquanto ligados quimicamente, é a mesma, o que permite que ambos os fármacos se concentrem igualmente na biofase.

A presença de grupos funcionais em fármacos e transportadores permite a formação de ligação química entre eles, cuja labilidade varia com o tipo obtido: amida, enamina, éster, carbamato, éter, fosfamida, entre outros (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988). O tipo de ligação desempenha papel de alta relevância na velocidade e natureza da liberação do fármaco (enzimática ou química).

Por outro lado, a escolha do transportador ou espaçante adequado afeta tanto o grau de absorção e distribuição do composto inativo, quanto à velocidade de liberação dos fármacos, permitindo o alcance de seletividade e de ação prolongada,

reduzindo, por conseguinte, a toxicidade (WERMUTH, 1984; KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988; WERMUTH, 1996).

O conceito de bioprecursor proposto por WERMUTH (1984) baseia-se no metabolismo de fármacos, onde muitos fármacos que são inativos *in vitro*, quando administrados num organismo vivo, possuem atividade. Isto ocorre por um processo chamado de ativação, onde alguns fármacos, após metabolizados (principalmente por reações de fase I), geram formas mais ativas que seu bioprecursor. Portanto, bioprecursor é uma forma latente, planejada com o intuito de que a forma ativa será sintetizada *in vivo* por reações enzimáticas (WERMUTH, 1996).

A ativação de bioprecursos ocorre no organismo vivo, principalmente através de reações de oxidação e redução, compreendidas pelas reações de fase I do metabolismo enzimático. Vários exemplos de bioprecursos são encontrados na literatura. A ciclofosfamida é um bioprecursor de uma mostarda nitrogenada, que é bioativada por desalquilação, seguido de clivagem espontânea ou catalisada por fosforamidases (figura 17) (WERMUTH, 1996). Isto reduz a toxicidade causada pela atividade em tecidos saudáveis, e aumenta a seletividade por tecidos neoplásicos, já que estes possuem seu metabolismo acelerado.

Figura 17: Esquema de bioativação da ciclofosfamida, liberando a mostarda nitrogenada alquilante (WERMUTH, 1996).

Outro exemplo de bioprecursor é uma forma latente do aciclovir proposta por KRENISTKY e cols. (1984), o 6-desoxiaciclovir. Esta forma, quando oxidada pela

xantina oxidase, sintetiza como produto o aciclovir, ativo. A vantagem deste bioprecursor é a maior solubilidade em água e, conseqüentemente, maior absorção.

A latenciação presta-se também a propiciar seletividade de ação de um fármaco. Conhecendo-se os sistemas enzimáticos, do pH dos fluídos biológicos, das células, dos tecidos e dos órgãos-alvo, consegue-se maior possibilidade de êxito do planejamento, uma vez que estes podem estar envolvidos na liberação dos mesmos (WERMUTH, 1996). Formas latentes que possuem liberação principalmente, ou exclusivamente, no órgão-alvo são classificadas como fármacos dirigidos (WERMUTH, 1984).

Na literatura, atualmente, a maior exploração de uso da latenciação encontra-se no direcionamento da liberação de fármacos em determinados locais, principalmente no caso dos fármacos antineoplásico, com a tentativa de aumentar a eficiência e diminuir a toxicidade da quimioterapia.

Um exemplo de direcionamento de liberação bastante engenhoso foi proposto por BODOR e cols. (1981), e posteriormente utilizado para o direcionamento de vários fármacos para o sistema nervoso central (SNC), como por exemplo, a zidovudina (BREWSTER *et al.*, 1997). Este sistema consiste na utilização de um transportador 1-metil-1,4-diidronicotinato, lipofílico, que é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), e quando penetra no SNC, é oxidado a um sal de amônio quaternário, hidrofílico, incapaz de atravessar novamente a BHE, impedindo a saída. Conseqüentemente, a liberação do fármaco se dará principalmente nesse órgão (BODOR, FARAG, BREWSTER, 1981; BREWSTER *et al.*, 1997).

Outro método que tem sido bem explorado para o direcionamento da liberação de formas latentes é a terapia com pró-fármacos dirigidos liberados por enzimas ligadas a anticorpos (*antibody directed enzyme prodrug therapy – ADEPT*) (WANG *et al.*, 2001; BOUVIER *et al.*, 2004). Este método baseia-se na administração prévia de um anticorpo monoclonal que reconhece o tecido-alvo, ligado a uma enzima preferencialmente xenobiótica (por exemplo, a beta-lactamase), pela sua fração Fc. Após a complexação anticorpo-tecido, administra-se um pró-fármaco cujo transportador seja substrato dessa enzima (para o mesmo exemplo,

um antibiótico beta-lactâmico). Após a catálise enzimática sobre o transportador, o fármaco ativo é liberado muito próximo do local de ação. Muitos fármacos têm sido direcionados por esse método, como o paclitaxel (BOUVIER *et al.*, 2004).

3.1. Justificativa

Apesar da existência de fármacos eficazes e seguros e os regimes terapêuticos empregados, não houve declínio substancial no problema epidemiológico global da tuberculose. Houve superestimação do que poderia ser alcançado pelos programas básicos contra a tuberculose. Na prática, os resultados foram menores do que os esperados (ISEMAN, 1993; BLOOM, 1994).

A situação atual requer a procura de fármacos antimicobacterianos novos e mais eficazes, uma vez que as formas de terapia são satisfatórias apenas em situações controladas e, na prática, há alta proporção de pacientes que não completam os regimes recomendados. Fármacos novos capazes de diminuir a duração do tratamento ajudarão a resolver este problema. Além disso, a frequência relativamente alta de cepas de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos disponíveis torna necessário o uso de outros fármacos que não apresentam resistência cruzada (TOMIOKA, 1993; SESIN, MANZI, PACHECO, 1996; DONG *et al.*, 1998; SILVA & FERREIRA, 1999; RAGNO *et al.*, 2000).

O tratamento da tuberculose deve envolver mais de um fármaco, a fim de prevenir o aparecimento de resistência e reduzir a duração do tratamento. Assim, é de grande importância buscar por alternativas que possam auxiliar no controle da doença, seja pelo desenvolvimento de novos quimioterápicos, seja pelo aprimoramento dos fármacos existentes (TOMIOKA, 1993). A utilização de pró-fármacos recíprocos, além de promover a atividade *in vivo* de cada fármaco *per se* após sua liberação, altera as características farmacocinéticas dos fármacos (WERMUTH, 1984).

3.2. Objetivos

Ante a necessidade de fármacos novos para combater os bacilos resistentes responsáveis pela tuberculose e da simplificação do tratamento que é longo e complexo, responsável pelas muitas falhas, este trabalho tem por objetivo obter pró-fármacos recíprocos do ácido pirazinóico e quinolonas ativas na tuberculose em estudos experimentais, como o ciprofloxacino, ofloxacino e levofloxacino.

Pretendeu-se, neste trabalho, ligar as quinolonas através de seu grupo carboxila ao ácido pirazinóico através de moléculas espaçantes, formando os correspondentes derivados ésteres, com o intuito de retardar a resistência através de duas maneiras: utilizando dois fármacos com mecanismos de ação diferentes e que sejam transportados através de ligação éster, que não necessita ser clivada pela pirazinamidase, ponto crucial no mecanismo de resistência à pirazinamida. Espera-se que, *in vivo*, após ataque enzimático ou químico, ocorra a liberação dos fármacos, exercendo cada qual sua ação, segundo seu mecanismo (WERMUTH, 1984, CHUNG & FERREIRA, 1999). Os fármacos latenciados terão ainda sua metabolização retardada, aumentando, conseqüentemente, sua meia-vida e seu tempo de ação no organismo. Com isso poderemos diminuir as doses, os efeitos indesejáveis, a complexidade do tratamento e, quiçá, o problema de resistência.

4.1. Material

- Ácido pirazinóico (Aldrich)
- 2-cloroetanol (Aldrich)
- 2-bromoetanol
- 1,3-dibromopropano (Merck)
- Brometo de etila (Merck)
- Brometo de hexila (Merck)
- Etilenoglicol (CRQ)
- Ciprofloxacino (Forlab)
- Ofloxacino (Forlab)
- Levofloxacino
- Cloreto de tionila (Merck)
- Trietilamina - TEA (CRQ)
- 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno – DBU (Merck)
- *N,N'*-Dicicloexilcarbodiimida – DCC (Merck)
- *N,N*-Dimetil-4-aminopiridina – DMAP (Merck)
- *N,N*-Dimetilformamida - DMF (Merck)
- Clorofórmio (CAAL)
- Diclorometano (Merck)
- Metanol (Merck)
- Acetona (Merck)
- Butanona (Merck)
- Acetonitrila (Merck)
- Tetraidrofurano - THF (Merck)
- Éter etílico (Merck)
- Carbonato de potássio (Synth)
- Carbonato de sódio (Dinâmica)
- Iodeto de potássio (Synth)
- Bicarbonato de sódio (Synth)
- Ácido clorídrico (CRQ)

- Hidróxido de sódio (Dinâmica)
- Hidróxido de potássio (Dinâmica)
- Clorofórmio-d₂ (CIL)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)-d₆ (CIL)
- Espectrômetro de infravermelho - FT-IR (Bomen)
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear - RMN (Bruker)
- Evaporador rotatório (Büchi)
- Chapas de aquecimento e agitação (Fisatom)
- Placas de cromatografia em camada delgada com revelador de fluorescência a 254nm (Merck)
- Vidrarias comuns de laboratório de síntese orgânica e análise
- Analisador de elementos Perkin-Elmer 2400 CHN
- Equipamento de ressonância magnética nuclear Bruker DPX-300, operando a 300MHz para ¹H e 75MHz para ¹³C
- Espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier Bomem FTIR Michelson
- Aparelho de ponto de fusão Marconi MA-381

4.2. Método

O método empregado na obtenção das formas latentes consiste na ligação entre a fluorquinolona e o ácido pirazinóico, através de um composto intermediário espaçante, por meio de ligação éster (FELDER, TIEPOLO, MEGASSINI, 1973; NEISES & STEGLICH, 1978; CYNAMON & KLEMENS, 1992; CYNAMON *et al.*, 1995; DOLEZAL *et al.*, 2002; SEITZ, SULING, REYNOLDS, 2002).

4.2.1. Obtenção do éster do ácido pirazinóico

Dentre as possíveis reações para obter o éster do ácido pirazinóico, pode ser utilizada a reação deste com cloreto de tionila para obtenção do cloreto de pirazinoíla. A seguir, é colocado no mesmo ambiente reacional o espaçante, devendo este ter uma hidroxila alcoólica, obtendo-se assim o éster correspondente (figura 18) (CYNAMON & KLEMENS, 1992; CYNAMON *et al.*, 1995).

Figura 18: Método de síntese dos ésteres do ácido pirazinóico através da reação com cloreto de acila

A seguir, obtém-se o cloreto de acila da quinolona pelo mesmo método, e este reage com a hidroxila terminal do espaçante, obtendo-se assim o pró-fármaco desejado.

Outra possibilidade, utilizando-se também a hidroxila alcoólica para a preparação do éster é a condensação do álcool com o ácido pirazinóico, utilizando-se para tal um agente condensante, como DCC (SEITZ, SULING, REYNOLDS, 2002), na presença de DMAP (figura 19). Em ambos os casos, se o composto espaçante tratar-se de um diálcool, como exemplo o etilenoglicol, deve-se controlar

a estequiometria da reação, de maneira que a duplicação do ácido pirazinóico seja minimizada. Isto pode ser conseguido colocando-se excesso do diálcool.

Figura 19: Método de síntese dos ésteres do ácido pirazinóico através da reação com DCC.

Utilizando-se como espaçante um composto que tenha um grupo haleto, pode-se utilizar como metodologia para obtenção do éster do ácido pirazinóico a substituição nucleofílica, que ocorre em presença de uma base, como DBU (ONO *et al.*, 1978), TEA e carbonatos, com o objetivo de gerar o carboxilato do ácido pirazinóico (figura 20) (SHAW, KUNERTH, SHERRY, 1973). Neste caso também, se o reagente for um di-haleto de alquila (como 1,3-dibromopropano), deve-se utilizá-lo em excesso para minimizar a possibilidade de duplicação (CLARK, EMSLEY, HOYTE, 1977).

Figura 20: Método de síntese dos ésteres do ácido pirazinóico por substituição nucleofílica.

4.2.2. Obtenção do éster da quinolona

Na reação de ligação do éster do ácido pirazinóico na forma de haleto de alquila às fluorquinolonas tuberculostáticas (ciprofloxacino, ofloxacino e levofloxacino), há a necessidade de obter o carboxilato destas últimas, o que poderá ser feito na presença de uma base. Pretende-se, então, efetuar a reação na presença de DBU, TEA ou outro reagente adequado para desprotonar a hidroxila do ácido da quinolona, obtendo o respectivo carboxilato, mais reativo e passível de reagir (figura 21) (ONO *et al.*, 1978; HOLÝ *et al.*, 2002).

Figura 21: Método de síntese dos pró-fármacos recíprocos de fluorquinolonas e ácido pirazinóico por substituição nucleofílica.

Pode-se também reagir o cloreto de acila da quinolona com o pirazinoato de 2-hidroxietila obtido (figura 22). Na possibilidade de obter-se primeiro o éster da quinolona, pode-se utilizar as mesmas metodologias usadas na obtenção do éster do ácido pirazinóico.

Figura 22: Esquema de síntese dos pró-fármacos recíprocos de fluorquinolonas e ácido pirazinóico pela reação com cloreto de acila.

4.2.3. Identificação

As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e os produtos obtidos foram caracterizados através de ponto de fusão (quando for pertinente), análise elementar e análises espectrométricas de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e de carbono (^{13}C -RMN).

4.2.4. Ensaio biológico preliminar *in vitro*

A atividade tuberculostática dos compostos foi testada pela professora Clarice Queico Fujimura Leite no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Foi utilizado o método da microdiluição em placas. Determinou-se, então, a concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o Alamar Blue como revelador, usando como cepas padrão o *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. intracellulare* e *M. malmoense* (FRANZBLAU *et al.*, 1998). O teste visa detectar se os compostos

são ativos, como molécula total, sem que seja necessária a liberação dos fármacos componentes.

5.1. Síntese do éster do ácido pirazinóico

5.1.1. Preparação do pirazinoato de 2-hidroxietila (3)

Procedimento 1

Para uma solução em agitação de 5mmol (0,620g) de ácido pirazinóico (1) em 5mL de DMF, adicionaram-se 35mg de DMAP e 1mL de etilenoglicol (2). Adicionaram-se 5mmol (1,032g) de DCC a 0°C e deixou-se sob agitação 5 minutos e, a seguir, 3 horas a temperatura ambiente. Filtrou-se o precipitado de dicitcloexiluréia e evaporou-se o filtrado sob pressão reduzida. Solubilizou-se o resíduo novamente, seguido de filtração. O filtrado foi lavado com HCl 0,5N, solução saturada de NaHCO₃ e seco em MgSO₄. Evaporou-se o solvente e o óleo resultante foi recolhido. A reação foi monitorada por CCD, usando clorofórmio:metanol (8:2) como eluente.

Figura 23: Esquema de síntese do pirazinoato de 2-hidroxietila pela reação com DCC.

Procedimento 2

Para uma solução de 5mmol (0,620g) de ácido pirazinóico (1) em 10mL de etilenoglicol (2) sob agitação, adicionou-se 5,5mmol de cloreto de tionila (0,650g – 10% excesso) e deixou-se sob refluxo por 24 horas. Destilou-se o solvente sob pressão reduzida e suspendeu-se o sólido novamente em água destilada e procedeu-se com extração com clorofórmio. A fase orgânica foi reservada, seca com Na₂SO₄ e evaporada. Monitorou-se a reação por CCD, usando clorofórmio:metanol (8:2) como eluente.

Figura 24: Esquema de síntese do pirazinoato de 2-hidroxietila pela reação com cloreto de pirazinoíla.

Procedimento 3

Em um balão de 25mL equipado com agitação magnética, chapa de aquecimento e condensador de refluxo, adicionaram-se 2mmol (0,324g) de pirazinoato de potássio (5), 0,26mmol (0,060g) de cloreto de trietilbenzilamônio (TEBA) em solução de 1,4mL de água, e 0,5mmol (0,080g) de 2-cloroetanol (6) em solução de 3,6mL de CCl_4 . Levou-se a refluxo por 120h sob agitação intensa. Resfriou-se e verteu-se em béquer com 12mL de água gelada. A fase orgânica foi separada e a fase aquosa foi extraída com éter etílico duas vezes. As fases etéreas foram reunidas, secas com Na_2SO_4 e evaporadas.

Figura 25: Esquema de síntese do pirazinoato de 2-hidroxietila por catálise por transferência de fase (CTF).

5.1.2. Preparação do pirazinoato de 2-cloroetila (7)

Em aproximadamente 20mL de 2-cloroetanol (6), adicionaram-se 5mmol (0,620g) de ácido pirazínico (1) sob agitação e refluxo. A seguir, adicionou-se à suspensão 5,5mmol (0,650g – 10% excesso) de cloreto de tionila. A solução permaneceu sob refluxo por 3 horas. A solução foi então destilada sob pressão reduzida e o líquido obtido foi seco sob vácuo. Adicionou-se 10mL de éter etílico, e a solução foi lavada com água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e evaporada. Monitorou-se a reação por CCD, usando clorofórmio:metanol (8:2) como eluente.

Figura 26: Esquema de síntese do pirazinoato de 2-cloroetila pela reação com cloreto de pirazinoíla.

5.1.3. Preparação do pirazinoato de 2-iodoetila (8)

Para uma solução de 5mmol (0,933g) de pirazinoato de 2-cloroetila (7) em 20mL de acetona, adicionou-se 50mmol (8,305g – 10x excesso) de iodeto de potássio e deixou-se sob refluxo e agitação vigorosa por 24 horas, protegido da luz. Filtrou-se o precipitado cloreto de potássio e o excesso de iodeto de potássio e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. Suspendeu-se novamente o sólido em clorofórmio, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Armazenou-se ao abrigo da luz e do calor. Monitorou-se a reação por CCD, com CHCl₃:MeOH (8:2) como eluente.

Figura 27: Esquema de síntese do pirazinoato de 2-iodoetila.

5.1.4. Preparação do pirazinoato de etila (10)

Procedimento 1

Em um balão de 25mL equipado com agitação magnética, chapa de aquecimento e condensador de refluxo, adicionaram-se 2mmol (0,324g) de pirazinoato de potássio (7), 0,26mmol (0,060g) de cloreto de trietilbenzilamônio em solução de 1,4mL de água, e 0,5mmol (0,055g) de brometo de etila (8) em solução de 3,6mL de CCl₄. Deixou-se sob agitação intensa por 48h. Resfriou-se e verteu-se em béquer com 12mL de água gelada. A fase orgânica foi separada e a fase aquosa extraída com éter etílico duas vezes. As fases etéreas foram reunidas, secas com Na₂SO₄ e evaporadas.

Figura 28: Esquema de síntese do pirazinoato de etila por CTF.

Procedimento 2

Em um balão de 125mL equipado com agitação magnética, adicionaram-se 5mmol (0,620g) de ácido pirazinóico (1), 5mmol (0,530g) de carbonato de sódio e 10mmol (1,089g) de brometo de etila (9) em 50mL de DMF. Deixou-se sob agitação vigorosa a aproximadamente 70 °C por 48h. A seguir, a mistura foi retirada do aquecimento e filtrada para remover o sal. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi ressuspensionado em CHCl_3 e lavado com água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e evaporada.

Figura 29: Esquema de síntese do pirazinoato de etila utilizando carbonato de sódio.

Procedimento 3

Em um balão de 125mL equipado com agitação magnética, adicionaram-se 5mmol (0,620g) de ácido pirazinóico (1), 5mmol (0,773g) de DBU e 10mmol (1,089g) de brometo de etila (9) em 50mL de DMF. Deixou-se sob agitação vigorosa a temperatura ambiente por 48h. A seguir, a mistura foi retirada do aquecimento e filtrada para remover o sal. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi ressuspensionado em CHCl_3 e lavado com água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e evaporada.

Figura 30: Esquema de síntese do pirazinoato de etila utilizando DBU.

Procedimento 4

Em um balão de 50mL, equipado com aquecimento, agitação magnética e condensador de refluxo, adicionaram-se 25mmol (3,102g) de ácido pirazinóico (1) e 25mmol (2,525g) de TEA em 25mL de acetonitrila. A mistura foi mantida em agitação e refluxo até a solubilização, e a partir desse momento deixou-se por 1h em refluxo. 50mmol (5,449g) de brometo de etila (9) foram adicionados e a reação foi mantida em refluxo por 6h. A mistura foi resfriada, filtrada sob vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi ressuspensionado em 25mL de CHCl_3 , lavado com 25mL de solução de NaHCO_3 5% e 25mL de água destilada. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 *overnight*, e evaporada sob pressão reduzida.

Figura 31: Esquema de síntese do pirazinoato de etila utilizando TEA.

5.1.5. Preparação do pirazinoato de hexila (13)

Procedimento 1

Em um balão de 125mL equipado com agitação magnética, aquecimento e condensador de refluxo, adicionaram-se 5mmol (0,620g) de ácido pirazinóico (1), 5mmol (0,530g) de carbonato de sódio e 10mmol (1,651g) de brometo de hexila (12) em 50mL de DMF. Deixou-se sob agitação vigorosa a 90°C por 48h. A seguir, a mistura foi resfriada e filtrada para remover o sal. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi ressuspensionado em CHCl_3 e lavado com água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e evaporada.

Figura 32: Esquema de síntese do pirazinoato de hexila utilizando carbonato de sódio.

Procedimento 2

Em um balão de 125mL equipado com agitação magnética, aquecimento e condensador de refluxo, adicionaram-se 5mmol (0,620g) de ácido pirazinóico (1), 5mmol (0,773g) de DBU e 10mmol (1,651g) de brometo de hexila (12) em 50mL de DMF. Deixou-se sob agitação vigorosa a 90°C por 48h. A seguir, a mistura foi retirada do aquecimento e filtrada para remover o sal. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi ressuspensionado em CHCl_3 e lavado com água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e evaporada.

Figura 33: Esquema de síntese do pirazinoato de hexila utilizando DBU.

Procedimento 3

Em um balão de 50mL, equipado com aquecimento, agitação magnética e condensador de refluxo, adicionaram-se 25mmol (3,102g) de ácido pirazinóico (1) e 25mmol (2,525g) de TEA em 25mL de acetonitrila. A mistura foi mantida em agitação e aquecimento até a solubilização, e a partir desse momento deixou-se por 1h em refluxo. 25mmol (4,127g) de brometo de hexila (12) foram adicionados e a reação foi mantida em refluxo por 24h. A mistura foi resfriada, filtrada sob vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O resíduo foi ressuspensionado em 25mL de CHCl_3 , lavado com 25mL de solução de NaHCO_3 5% e 25mL de água destilada. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 *overnight*, e evaporada sob pressão reduzida.

Figura 34: Esquema de síntese do pirazinoato de hexila utilizando TEA.

5.1.6. Preparação do pirazinoato de 3-bromopropila (15)

Procedimento 1

Em um balão de 2 bocas equipado com agitação magnética, aquecimento, funil de adição e condensador de refluxo, adicionou-se 10mmol (2,010g) de 1,3-dibromopropano (14) em 5mL de DMF anidro. A solução foi deixada sob forte agitação a 100°C e, neste momento, adicionou-se gota a gota uma solução de 5mmol (0,620g) de ácido pirazínico (1) e 5mmol (0,505g) de TEA em 10mL de DMF. A mistura foi deixada a 100°C por 4h. O solvente e o excesso de haleto orgânico foram evaporados sob pressão reduzida e o resíduo foi ressuspensionado em CHCl_3 e lavado com água. A fase aquosa foi extraída com éter etílico duas vezes. As fases orgânicas foram reunidas, secas com Na_2SO_4 e evaporadas.

Figura 35: Esquema de síntese do pirazinoato de 3-bromopropila utilizando TEA.

Procedimento 2

Em um balão de 50mL, equipado com agitação magnética, condensador de refluxo e aquecimento, adicionaram-se 5mmol (0,811g) de pirazinoato de potássio (5) e 10mmol (2,010g) de 1,3-dibromopropano (14) em 25mL de DMF. A mistura foi deixada a 100°C por 48h sob forte agitação. A seguir, o precipitado foi filtrado, e evaporou-se o solvente e o excesso de alquilante sob pressão reduzida. O resíduo foi ressuspensionado em mistura de CHCl_3 :MeOH (4:1) e submetido à separação por coluna cromatográfica, utilizando a mesma mistura como eluente.

Figura 36: Esquema de síntese do pirazinoato de 3-bromopropila utilizando pirazinoato de potássio.

5.1.7. Preparação do dipirazinoato de 1,3-propanodiila (16)

Em um balão de 50mL, equipado com agitação magnética, condensador de refluxo e aquecimento, adicionaram-se 10mmol (1,241g) de ácido pirazínico (1) e 11mmol (1,111g) de TEA em cerca de 25mL de acetonitrila. Deixou-se a solução em forte agitação e refluxo por 1h. A seguir, foram adicionados 10mmol (4,020g) de 1,3-dibromopropano (14) e a solução permaneceu por mais 24h em refluxo. O solvente foi então evaporado e ao resíduo adicionou-se 25mL de CHCl_3 . A solução foi extraída com solução aquosa de NaHCO_3 5% e água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e evaporada.

Figura 37: Esquema de síntese do dipirazinoato de 1,3-propanodiila utilizando TEA.

5.2. Síntese do éster do ofloxacino

5.2.1. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-cloroetila (19)

Em um balão de 50mL equipado com agitação magnética e condensador de refluxo, adicionaram-se 0,5mmol (0,186g) de ofloxacino (17) e cerca de 20mL de 2-cloroetanol (6). A solução foi mantida com agitação vigorosa a 80°C e, a seguir, adicionou-se 0,55mmol (0,065g – 10% excesso) de SOCl_2 . A reação foi mantida por 48h, em condições anidras. Destilou-se a mistura e o sólido resultante foi ressuspensionado em 20mL da mistura de CHCl_3 :MeOH (4:1) e lavado com solução de NaHCO_3 5% e água. A fase orgânica foi seca, concentrada e submetida à separação por cromatografia de coluna, utilizando-se a mistura CHCl_3 :MeOH:TEA (8:2:1) como eluente.

Figura 38: Esquema de síntese do éster 2-cloroetílico do ofloxacino pela reação com cloreto de acila.

5.2.2. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-hidroxietila (20)

Procedimento 1

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 0,5mmol (0,040g) de 2-cloroetanol (6). Pesou-se 0,5mmol (0,186g) de ofloxacino (17), 0,05mmol (0,010g) de cloreto de trietilbenzilamônio (TEBA) e 0,5mmol (0,069g) de K_2CO_3 e homogeneizou-se. A mistura foi adicionada a um tubo de ensaio e colocada em microondas, por 5 minutos, à potência de 540W. A mistura resultante foi avaliada por CCD.

Figura 39: Esquema de síntese do éster 2-hidroxietílico do ofloxacino por irradiação de microondas a 540W, utilizando-se 2-cloroetanol.

Procedimento 2

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 0,5mmol (0,040g) de 2-cloroetanol (6). Pesou-se 0,5mmol (0,186g) de ofloxacino (17), 0,05mmol (0,010g) de cloreto de trietilbenzilamônio e 0,5mmol (0,069g) de K₂CO₃ e homogeneizou-se. A mistura foi adicionada a um tubo de ensaio e foi colocada em microondas, por 5 minutos, à potência de 630W. A mistura resultante foi avaliada por CCD.

Figura 40: Esquema de síntese do éster 2-hidroxietílico do ofloxacino por irradiação de microondas a 630W, utilizando-se 2-cloroetanol.

Procedimento 3

Em um balão de 50mL, equipado com agitação magnética, aquecimento e condensador de refluxo, adicionaram-se 0,5mmol (0,181g) de ofloxacino (17) em cerca de 25mL de DMF. A mistura foi mantida a 60°C sob agitação vigorosa até a solubilização do fármaco. Neste momento, adicionou-se 0,5mmol (0,051g) de TEA e deixou-se agitar por 1h. Foram adicionados 0,75mmol (0,094g) de 2-bromoetanol (21) e permitiu-se reagir por 24h. O solvente foi então evaporado sob pressão reduzida, e a massa resultante ressuspensa em 25mL de CHCl₃, lavada com 25mL de solução de NaHCO₃ 5% e 25mL de água destilada. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida.

Figura 41: Esquema de síntese do éster 2-hidroxietílico do ofloxacino pela reação com 2-bromoetanol e TEA em DMF.

Procedimento 4

Em um balão de 50mL, equipado com agitação magnética, aquecimento e condensador de refluxo, adicionou-se 0,5mmol (0,181g) de ofloxacino (17) em cerca de 25mL de MeCN. A mistura foi mantida a 60°C sob agitação vigorosa até a solubilização do fármaco. Neste momento, adicionou-se 0,5mmol (0,051g) de TEA e deixou-se agitar por 1h. Foram adicionados 0,75mmol (0,094g) de 2-bromoetanol (21) e permitiu-se reagir por 24h. O precipitado formado foi então filtrado com a mistura ainda aquecida e após recristalizado em MeCN.

Figura 42: Esquema de síntese do éster 2-hidroxietílico do ofloxacino pela reação com 2-bromoetanol e TEA em MeCN.

5.2.3. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 3-bromopropila (22)

Procedimento 1

Em um balão de 125mL equipado com aquecimento, agitação magnética e condensador de refluxo, adicionaram-se 1mmol (0,361g) de ofloxacino (17), 10mmol (2,010g) de 1,3-dibromopropano (14) e 1,1mmol (0,112g) de TEA em cerca de 60mL de acetonitrila. A mistura foi deixada sob agitação vigorosa e refluxo por 60h. A seguir, o solvente foi evaporado e o resíduo ressuspendido em pequena quantidade de mistura de CHCl_3 :MeOH e submetido à separação por coluna cromatográfica com CHCl_3 :MeOH (8:2) como eluente.

Figura 43: Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e TEA.

Procedimento 2

Em um balão de 50mL, equipado com condensador de refluxo, aquecimento e agitação magnética, adicionaram-se 1mmol (0,399g) de sal de potássio do ofloxacino (23) e 10mmol (2,010g) de 1,3-dibromopropano (14) em aproximadamente 25mL de DMF. A mistura foi deixada a 100°C sob agitação vigorosa por 48h. A seguir, o precipitado é filtrado, o solvente e o excesso de haleto orgânico foram evaporados, e o resíduo ressuspensionado em 25mL de CHCl_3 :MeOH (4:1). Lavou-se a solução com 25mL de NaHCO_3 5% em solução aquosa e água destilada. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e evaporada.

Figura 44: Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e carboxilato de potássio.

Procedimento 3

Em um balão de 125mL, equipado com agitação magnética, aquecimento e condensador de refluxo, adicionaram-se 5mmol (1,805g) de ofloxacino (17) e 5mmol (0,700g) de carbonato de potássio anidro em cerca de 60mL de DMF. Deixou-se sob agitação vigorosa a 90°C por 1h. A seguir, foram adicionados 10mmol (2,010g) de 1,3-dibromopropano (14) e a mistura permaneceu a 90°C por 24h. O solvente e o excesso de haleto foram evaporados sob pressão reduzida e o sólido resultante foi ressuspensionado em mistura CHCl_3 :MeOH (4:1) e extraído com solução aquosa de NaHCO_3 a 5% e água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro e evaporada. A massa resultante foi cristalizada com acetato de etila e filtrada.

Figura 45: Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e carbonato de potássio.

5.3. Síntese do éster do ciprofloxacino

5.3.1. Preparação do 1-ciclopropil-6-flúor-4-oxo-7-piperazin-1-il-1,4-diidroquinolino-3-carboxilato de 3-bromopropila (25)

Procedimento 1

Em um balão de 125mL, equipado com agitação magnética, aquecimento e condensador de refluxo, adicionaram-se 1mmol (0,313g) de ciprofloxacino (24), 10mmol (2,010g) de 1,3-dibromopropano (14) e 2mmol (0,202g) de TEA em cerca de 50mL de DMF. A mistura foi mantida a 100°C por 48h, sob forte agitação. A seguir, o precipitado formado foi filtrado e o filtrado é evaporado. Ressuspendeu-se o resíduo em CH₂Cl₂ e filtrou-se o precipitado novamente. O solvente foi evaporado e o resíduo ressuspendido em CHCl₃:MeOH (4:1) e submetido à separação por cromatografia de coluna, usando CHCl₃:MeOH:TEA (8:2:1) como fase móvel.

Figura 46: Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ciprofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e TEA em DMF.

Procedimento 2

Em um balão de 125mL, equipado com agitação magnética, aquecimento e condensador de refluxo, adicionaram-se 1mmol (0,313g) de ciprofloxacino (24) e 2mmol (0,202g) de TEA em cerca de 50mL de MeCN. A mistura foi mantida a 90°C por 1h, sob forte agitação e, a seguir, adicionou-se 5mmol (1,005g) de 1,3-dibromopropano (14). A suspensão foi mantida em agitação por mais 48h. O precipitado então foi filtrado e o filtrado é evaporado. Ressuspendeu-se o resíduo em CH₂Cl₂ e filtrou-se o precipitado novamente. O solvente foi evaporado e o resíduo ressuspendido em CHCl₃:MeOH (4:1) e submetido à separação por cromatografia de coluna, usando CHCl₃:MeOH:TEA (8:2:1) como fase móvel.

Figura 47: Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ciprofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e TEA em MeCN.

Procedimento 3

Em um balão de 125mL, equipado com agitação magnética, aquecimento e condensador de refluxo, adicionaram-se 5mmol (1,565g) de ciprofloxacino (24) e 5mmol (0,700g) de carbonato de potássio anidro em cerca de 60mL de DMF. Deixou-se sob agitação vigorosa a 90°C por 1h. A seguir, foram adicionados 10mmol (2,010g) de 1,3-dibromopropano (14) e a mistura permaneceu a 90°C por 24h. O solvente e o excesso de haleto foram evaporados sob pressão reduzida e o sólido resultante foi ressuspensionado em mistura CHCl₃:MeOH (4:1) e extraído com solução aquosa de bicarbonato de sódio 5% e água. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e evaporada. A massa resultante foi cristalizada com acetato de etila e filtrada.

Figura 48: Esquema de síntese do éster 3-bromopropílico do ciprofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e carbonato de potássio.

5.3.2. Preparação do 1-ciclopropil-6-flúor-4-oxo-7-piperazin-1-il-1,4-diidroquinolino-3-carboxilato de 2-hidroxietila (26)

Em um balão de 50mL, equipado com agitação magnética, aquecimento e condensador de refluxo, adicionou-se 0,5mmol (0,157g) de ciprofloxacino (24) em cerca de 25mL de DMF. A mistura foi mantida a 60°C sob agitação vigorosa até a solubilização do fármaco. Neste momento, adicionou-se 0,5mmol (0,051g) de TEA e deixou-se agitar por 1h. Foram adicionados 0,75mmol (0,094g) de 2-bromoetanol (21) e permitiu-se reagir por 24h. O solvente foi então evaporado sob pressão

reduzida, e a massa resultante ressuspensa em 25mL de CHCl_3 , lavada com 25mL de solução de NaHCO_3 5% e 25mL de água destilada. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 e evaporada sob pressão reduzida.

Figura 49: Esquema de síntese do éster 2-hidroxietílico do ciprofloxacino pela reação com 2-bromoetanol e TEA.

5.4. Síntese do pró-fármaco mútuo de ácido pirazinóico e ofloxacino

5.4.1. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-(pirazino-2-carbonilóxi)-etila (27)

Procedimento 1

Para uma solução de 0,5mmol de ofloxacino (17 – 0,181g) em 15mL de THF sob refluxo, adicionaram-se 0,5mmol de DBU (0,085g) e 0,5mmol de pirazinoato de 2-cloroetila (7). A solução permaneceu sob refluxo por 24 horas. Evaporou-se o solvente e suspendeu-se o sólido novamente em éter etílico. A mistura foi lavada com solução de NaHCO_3 5% e água destilada duas vezes. Evaporou-se a fase orgânica. Monitorou-se a reação por CCD.

Figura 50: Esquema de síntese do pró-fármaco mútuo de ácido pirazinóico e ofloxacino utilizando DBU.

Procedimento 2

Em um balão de 25mL equipado com agitação magnética, chapa de aquecimento e condensador de refluxo, adiciona-se 0,5mmol (0,205g) do sal de potássio do ofloxacino (23), 0,065mmol (0,013g) de cloreto de trietilbenzilamônio em solução de 0,7mL de água, e 0,13mmol (0,025g) de pirazinoato de 2-cloroetila (7) em solução de 1,8mL de CCl_4 . Levou-se a refluxo por 120h sob agitação intensa. Resfriou-se e jogou-se em béquero com 10mL de água gelada e adicionou-se 8mL de CCl_4 . A fase orgânica é separada e a fase aquosa é extraída com éter etílico duas vezes. As fases etéreas são reunidas, secas com Na_2SO_4 e evaporada.

Figura 51: Esquema de síntese do pró-fármaco mútuo de ácido pirazinóico e ofloxacino por CTF.

5.4.2. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 3-(pirazino-2-carbonilóxi)-propila (28)

Em um balão de duas bocas de 100mL, equipado com condensador de refluxo, agitação magnética, aquecimento e funil de adição, adicionou-se 2mmol (0,404g) de 1,3-dibromopropano (14) em 5mL de DMF anidro. Deixou-se em agitação vigorosa a 100°C por 5 minutos. Adicionaram-se, gota a gota, uma solução de 2mmol (0,248g) de ácido pirazinóico (1) e 2mmol (0,305g) de DBU em 10mL de DMF anidro. Deixou-se reagir por 36h. A seguir, adicionaram-se 2mmol (0,723g) de ofloxacino (17) e 2mmol de DBU em 20mL de DMF e deixou-se reagir por 60h. As condições do sistema mantiveram-se anidras. O solvente foi então evaporado e o resíduo ressuspendido em pequena quantidade de mistura de CHCl_3 :MeOH (4:1). A solução resultante foi submetida à separação por cromatografia de coluna, usando CHCl_3 :MeOH:TEA (8:2:1) como fase móvel.

Figura 52: Esquema de síntese do pró-fármaco mútuo de ácido pirazinóico e ofloxacino pela reação com 1,3-dibromopropano e DBU.

5.5. Síntese do 2-iodoetanol (29)

Para uma solução de 10mmol (0,805g) de 2-cloroetanol (6) em 20mL de butanona, adicionou-se 50mmol (5x excesso) de iodeto de potássio. Deixou-se sob refluxo e agitação vigorosa por 24 horas e ao abrigo da luz. A seguir, filtrou-se a mistura e evaporou-se o solvente. Suspendeu-se novamente o resíduo em éter etílico, filtrou-se e evaporou-se o solvente.

Figura 53: Esquema de síntese do 2-iodoetanol.

5.6. Síntese do 2-bromoetanol (21)

Em um balão de 200mL de três bocas, equipado com agitação magnética, funil de adição e sistema de entrada e saída de gás argônio, foi adicionado 1mol (62,07g ~ 55,74mL) de etilenoglicol (2) anidro em banho de gelo e deixou-se sob agitação vigorosa. A seguir, foram adicionados gota a gota 0,1mol (27,07g ~ 9,5mL) de tribrometo de fósforo, através do funil de adição. A mistura foi deixada sob agitação vigorosa *overnight* e, a seguir, fracionadamente destilada sob pressão reduzida.

Figura 54: Esquema de síntese do 2-bromoetanol.

5.7. Síntese dos carboxilatos

5.7.1. Preparação do pirazinoato de potássio (5)

Em um erlenmeyer de 125mL, adicionou-se 10mmol (1,241g) de ácido pirazinóico (1) em 25mL de água destilada. Utilizando-se uma bureta, adicionou-se gota a gota 10mmol (0,561g) de hidróxido de potássio em solução aquosa de 25mL. A solução resultante foi transferida para dois balões e submetida à liofilização.

5.7.2. Preparação do 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de potássio (23)

Em um erlenmeyer de 125mL, adicionou-se 1,5mmol (0,542g) de ofloxacino (17) em 25mL de água destilada. Utilizando-se uma bureta, adicionou-se gota a gota 1,5mmol (0,084g) de hidróxido de potássio em solução aquosa de 25mL. A solução resultante foi transferida para dois balões e submetida à liofilização.

5.8. Ensaio Biológico Preliminar *In Vitro*

Em uma microplaca estéril de 96 orifícios foram depositados 200µl de água destilada estéril em todos os orifícios da periferia da microplaca, para evitar a evaporação durante a incubação na estufa. Os compostos (ácido pirazinóico, pirazinoato de 2-cloroetila e ciprofloxacino) foram diluídos em DMSO para se obter soluções e, em seguida, foram diluídos no caldo 7H9 (Middlebrook 7H9) de maneira a se obter concentrações variáveis dos compostos, com concentração inicial de 250µg/mL. A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37RV – ATCC 27294 foi cultivada no caldo 7H9 a 37°C até atingir a turvação igual à escala McFarland nº 1. A cultura foi diluída 25 vezes, e então 100µl da diluição inoculada em cada um dos orifícios contendo as soluções dos compostos. As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37°C por 6 dias, quando foi adicionado o Alamar Blue aos orifícios controle de cepa micobacteriana. As placas foram reincubadas por 24 horas e, após, foi realizada a leitura. A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rósea, como de multiplicação bacteriana. As placas que apresentam orifícios violeta são reincubadas por mais 24 horas, e se a cor mudar para róseo, foi considerado positivo para crescimento bacteriano. Caso persista a cor inicial, o resultado é negativo. A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração do fármaco capaz de impedir a mudança de cor azul para róseo (FRANZBLAU *et al.*, 1998).

6.1. Resultados**6.1.1. Pirazinoato de 2-hidroxietila** **Figura 55:** Pirazinoato de 2-hidroxietila.*Procedimento 1*

Obteve-se um líquido viscoso, de coloração amarelada. O isolamento não foi possível para a caracterização do produto.

Procedimento 2

Obteve-se um líquido viscoso, de coloração amarelada. Não foi possível isolar o produto.

Procedimento 3

Obteve-se um sólido levemente róseo e amorfo. Pela CCD conclui-se que se tratava de uma mistura dos compostos de partida.

6.1.2. Pirazinoato de 2-cloroetila **Figura 56:** Pirazinoato de 2-cloroetila.

Obteve-se um líquido viscoso, amarelado, miscível com clorofórmio, diclorometano, éter etílico, etanol e acetato de etila e imiscível com água. O ponto de ebulição não pôde ser determinado.

Rendimento: 0,84g (90%).

IV (NaCl): ν_{max} : C=O_{éster} 1737,38 cm⁻¹ (anexo I).

¹H-RMN (300MHz), CDCl₃, padrão interno tetrametilsilano (TMS): 9,34ppm (s, H7, 1H); 8,87ppm (s, H4, 1H); 8,82ppm (s, H5, 1H); 4,75ppm (t, H1', J = 5,6Hz, 2H); 3,95ppm (t, H2', J = 5,6Hz, 2H) (anexo II).

¹³C-RMN (75MHz), CDCl₃, TMS: 163,54ppm (C1); 147,96ppm (C5); 146,44ppm (C7); 144,60ppm (C4); 143,05ppm (C2); 65,48ppm (C1'); 41,18ppm (C2') (anexo III).

Análise elementar: Calculada C = 45,06%; H = 3,78%; N = 15,01%; Cl = 19,00%. Experimental C = 44,18%; H = 3,69%; N = 14,60%; Cl = 18,90%.

6.1.3. Pirazinoato de 2-iodoetila

Figura 57: Pirazinoato de 2-iodoetila.

Obteve-se um líquido extremamente viscoso, de coloração escura. Os espectros de RMN não indicaram formação de produto, sendo apenas encontrado o composto de partida.

6.1.4. Pirazinoato de etila

Figura 58: Pirazinoato de etila.

Procedimento 1

Obteve-se um sólido branco e amorfo. Os dados cromatográficos indicaram tratar-se dos compostos de partida.

Procedimento 2

Obteve-se um sólido cristalino, de coloração amarelada e faixa de fusão de 44 a 46 °C.

Rendimento: 0,38g (50%)

IV (KBr): ν_{max} : C=O_{éster} 1736,8 cm⁻¹ (anexo IV).

¹H-RMN (300MHz), CDCl₃, TMS: 9,33ppm (d, H7, J = 1,4Hz, 1H); 8,78ppm (d, H4, J = 2,4Hz, 1H); 8,74ppm (dd, H5, J_1 = 2,4Hz, J_2 = 1,4Hz, 1H); 4,53ppm (m, H1', J = 7,1Hz, 2H); 1,47ppm (t, H2', J = 7,1Hz, 3H) (anexo V).

¹³C-RMN (75MHz), CDCl₃, TMS: 164,01ppm (C1); 147,69ppm (C5); 146,35ppm (C7); 144,49ppm (C4); 143,68ppm (C2); 62,48ppm (C1'); 14,34ppm (C2') (anexo VI).

Análise elementar: Calculada C = 55,26%; H = 5,30%; N = 18,41%.
Experimental C = 55,19%; H = 5,33%; N = 18,21%.

Procedimento 3

Obteve-se um sólido amarelo cristalino, faixa de fusão 45 a 47 °C.

Rendimento: 0,53g (70%)

Procedimento 4

Obteve-se um sólido amarelo cristalino, faixa de fusão 46 a 47 °C.

Rendimento: 2,95g (78%)

6.1.5. Pirazinoato de hexila

Figura 59: Pirazinoato de hexila.

Procedimento 1

Obteve-se um líquido viscoso, de cor amarelada. O ponto de ebulição não foi determinado.

Rendimento: 0,50g (48%)

IV (NaCl): ν_{max} : C=O_{éster} 1746,0 cm^{-1} (anexo VII).

^1H -RMN (300MHz), CDCl_3 , TMS: 9,32 (d, H7, $J = 1,3\text{Hz}$, 1H); 8,78 (d, H4, $J = 2,4\text{Hz}$, 1H); 8,76 (dd, H5, $J_1 = 1,3\text{Hz}$, $J_2 = 2,4\text{Hz}$, 1H); 4,45 (t, H1', $J = 6,9\text{Hz}$, 2H); 1,84 (quint., H2', $J = 6,9\text{Hz}$, 2H); 1,44 (m, H4', 2H); 1,35 (m, H3', H5', 4H); 0,90 (t, H6', $J = 5,8\text{Hz}$, 3H) (anexo VIII).

^{13}C -RMN (75MHz), CDCl_3 , TMS: 164,00 (C1); 147,61 (C5); 146,27 (C7); 144,50 (C4); 143,70 (C2); 66,53 (C1'); 31,44 (C4') 28,60 (C2'); 25,58 (C3'); 22,54 (C5'); 14,01 (C6') (anexo IX).

Procedimento 2

Foi obtido um líquido viscoso e amarelado. O ponto de ebulição não foi determinado.

Rendimento: 0,65g (62%)

Procedimento 3

Obteve-se um líquido amarelado e viscoso. O ponto de ebulição não foi determinado.

Rendimento: 3,85g (74%)

6.1.6. Pirazinoato de 3-bromopropila

Figura 60: Pirazinoato de 3-bromopropila.

Procedimento 1

Foi obtido um líquido extremamente viscoso, de cor escura. Não foi possível isolar o produto de forma a obter espectros que permitissem a caracterização.

Procedimento 2

Foi obtida uma massa escura, porém, não foi possível isolar o produto para caracterização espectroscópica.

6.1.7. Dipirazinoato de 1,3-propanodiila

Figura 61: Dipirazinoato de 1,3-propanodiila.

Foi obtida uma massa de cor escura, porém, não se isolou o produto para conseguir os dados espectroscópicos.

6.1.8. 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-cloroetila

Figura 62: Éster 2-cloroetílico do ofloxacino.

Obteve-se um sólido branco amorfo. Dados cromatográficos mostraram tratar-se de uma mistura de muitas substâncias, e o isolamento do produto não foi possível.

6.1.9. 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-hidroxietila

Figura 63: Éster 2-hidroxietílico do ofloxacino.

Procedimento 1

Os dados cromatográficos não indicaram formação apreciável de algum produto.

Procedimento 2

Não foi possível isolar produto algum devido à carbonização no ambiente reacional.

Procedimento 3

Obteve-se um sólido amorfo, de cor levemente amarelada. O produto desejado não foi isolado com pureza adequada para obter dados espectroscópicos.

Procedimento 4

Obteve-se um sólido branco, amorfo. Faixa de fusão não determinada.

Rendimento: 21%

IV (KBr): ν_{max} : C=O_{éster} 1725,3 cm⁻¹ (anexo X).

¹H-RMN (300MHz), DMSO-*d*₆, TMS: 9,01ppm (s, H2, 1H); 7,63ppm (d, H6, $J_{\text{HF}} = 12,0\text{Hz}$, 1H); 5,36ppm (t, H3', $J = 4,5\text{Hz}$, 1H); 4,95ppm (q, H13, $J = 6,0\text{Hz}$, 1H); 4,61ppm (d, H12a, $J_1 = 10,5\text{Hz}$, 1H); 4,40ppm (d, H12b, $J_1 = 10,5\text{Hz}$, 1H); 3,90ppm (m, H2', 2H); 3,63ppm (m, H1',2'',3'', 10H); 3,26ppm (s, H5'', 3H), 1,45ppm (d, H14, $J = 6,0\text{Hz}$, 3H) (anexo XI).

¹³C-RMN (75MHz), DMSO-*d*₆, TMS: 175,99ppm (C4); 165,55ppm (C15); 146,11ppm (C2); 140,09ppm (C9); 124,32ppm (C10); 120,19ppm (C5); 106,43ppm (C3); 102,87ppm (d, C6); 67,91ppm (C12); 63,93ppm (C1'); 60,13ppm (C2'', C3''); 54,44ppm (C13); 54,15ppm (C2'); 47,11ppm (C5''); 17,58ppm (C14) (anexo XII).

Tabela 5: correlação heteronuclear entre espectros de RMN de ¹H e ¹³C (anexo XIII).

Correlação ¹ H-RMN (300MHz) x ¹³ C-RMN (75MHz), DMSO- <i>d</i> ₆ , $\delta = \text{ppm}$ (TMS)			
H2 (9,01ppm)	C2 (146,11ppm)	H2' (3,90ppm)	C2' (54,15ppm)
H6 (7,64ppm)	C6 (102,87ppm)	H1',H2'',H3'' (3,63ppm)	C1 (63,93ppm) C2'',C3'' (60,13ppm)
H13 (4,95ppm)	C13 (54,44ppm)	H5'' (3,26ppm)	C5'' (47,11ppm)
H12a (4,61ppm) H12b (4,41ppm)	C12 (67,91ppm)	H14 (1,45ppm)	C14 (17,58ppm)

6.1.10. 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 3-bromopropila

Figura 64: Éster 3-bromopropílico do ofloxacino.

Procedimento 1

Obteve-se um sólido levemente amarelado, amorfo. Não foi possível isolar o produto em quantidades suficientes para realizar os ensaios espectroscópicos.

Procedimento 2

Obteve-se um sólido amorfo de cor amarelada. Não se isolou o produto em quantidades desejáveis.

Procedimento 3

Obteve-se uma massa elástica, de cor marrom. Os dados cromatográficos não mostraram quantidades apreciáveis de algum produto formado.

6.1.11. 1-ciclopropil-6-flúor-4-oxo-7-piperazin-1-il-1,4-diidro-quinolino-3-carboxilato de 3-bromopropila

Figura 65: Éster 3-bromopropílico do ciprofloxacino.

Procedimento 1

Não foi possível obter quantidades suficientes de produto para a caracterização.

Procedimento 2

Não foi possível obter o produto em quantidades suficientes para proceder com a caracterização.

Procedimento 3

Obteve-se um sólido amorfo, de cor levemente amarelada. A faixa de fusão não foi determinada.

Rendimento: 15%

IV (KBr): ν_{max} : C=O_{éster} 1722,69 cm^{-1} (anexo XIV).

6.1.12. 1-ciclopropil-6-flúor-4-oxo-7-piperazin-1-il-1,4-diidro-quinolino-3-carboxilato de 2-hidroxietila

Figura 66: Éster 2-hidroxietílico do ciprofloxacino.

Os dados cromatográficos mostraram não haver formação apreciável de produto desejado.

6.1.13. 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 2-(pirazino-2-carbonilóxi)-etila

Figura 67: Pró-fármaco mútuo do ácido pirazinóico e ofloxacino com espaçante etilênico.

Procedimento 1

Pelos dados da cromatografia, não se pôde notar formação apreciável de produto.

Procedimento 2

Obteve-se um sólido amarelo cristalino. A cromatografia mostrou tratar-se apenas de compostos de partida, sem formação de produtos.

6.1.14. 8-flúor-3-metil-9-(4-metil-piperazin-1-il)-6-oxo-2,3-diidro-6H-1-oxa-3a-aza-fenaleno-5-carboxilato de 3-(pirazino-2-carbonilóxi)-propila

Figura 68: Pró-fármaco mútuo do ácido pirazinóico e ofloxacino com espaçante propilênico.

Obteve-se uma massa amarelada e elástica. Os dados cromatográficos mostraram uma grande quantidade de produtos, que foi impossível isolar cada um individualmente.

6.1.15. 2-iodoetanol

Figura 69: 2-Iodoetanol.

Obteve-se um líquido viscoso, de cor preta. Os dados espectroscópicos mostraram tratar-se apenas do composto de partida.

6.1.16. 2-bromoetanol

Figura 70: 2-Bromoetanol.

Obteve-se um líquido viscoso, incolor. O ponto de ebulição não foi determinado.

Rendimento: 23,6g (63%)

¹H-RMN (300MHz), CHCl₃, TMS: 3,94ppm (t, H₂, *J* = 6Hz, 2H); 3,55ppm (t, H₃, *J* = 6Hz, 2H); 2,90ppm (s, H₁, 1H) (anexo XV).

¹³C-RMN (75MHz), CHCl₃, TMS: 62,63ppm (C₂); 35,40ppm (C₃) (anexo XVI).

6.1.17. Ensaio biológico preliminar *in vitro*

Tabela 6: Concentração inibitória mínima (CIM) obtida para o ácido pirazinóico, ciprofloxacino e pirazinoato de 2-cloroetila utilizando o método da microdiluição em tubos e detecção com Alamar Blue (MABA).

Fármacos	CIM (µg/ml)
ácido pirazinóico	15,62
ciprofloxacino	3,96
pirazinoato de 2-cloroetila	3,96

6.2. Discussão

O planejamento de fármacos antimicobacterianos é de enorme importância atualmente, visto que a tuberculose continua sendo uma das doenças infecciosas mais importantes, entretanto, ainda com terapia bastante antiga e demorada. Muitos pesquisadores estão à procura de novos fármacos e pró-fármacos para a terapia antimicobacteriana.

Uma das alternativas exploradas é a utilização de pró-fármacos do ácido pirazinóico, já que este é a forma ativa da pirazinamida, porém, por ser mais polar, tem dificuldade de atravessar a parede celular hidrofóbica das micobactérias. CYNAMON & KLEMENS (1992) propuseram a utilização de ésteres do ácido pirazinóico para conseguir formas mais lipofílicas do fármaco, capazes de atravessarem a parede celular. Foram sintetizados vários compostos que apresentaram atividade, sendo que os 5-cloropirazinoatos e 5-metilpirazinoatos foram os análogos mais promissores (CYNAMON & KLEMENS, 1992; CYNAMON *et al.*, 1995). Outros autores também avaliaram alguns ésteres do ácido pirazinóico, com bons resultados (SEITZ, SULING, REYNOLDS, 2002).

Outra possibilidade explorada é a utilização de antibacterianos de amplo espectro que possuem atividade antimicobacteriana, como as fluorquinolonas (ALANGADEN & LERNER, 1997). Vários autores têm concentrado esforços na obtenção de quinolonas com atividade antimicobacteriana cada vez mais aprimorada, inclusive produzindo estudos de REA (KLOPMAN *et al.*, 1996; RENAULT *et al.*, 1996).

Alguns pró-fármacos de fluorquinolonas encontram-se descritos na literatura (ERTAN *et al.*, 1992; MAEDA *et al.*, 1993; DOBIAS *et al.*, 1995; PANDEYA *et al.*, 2000; PANDEYA *et al.*, 2001; BAKER *et al.*, 2004). Porém, o planejamento de pró-fármacos antimicobacterianos de fluorquinolonas é ainda pouco explorado.

A síntese de pró-fármacos recíprocos de ácido pirazinóico e fluorquinolonas com finalidade tuberculostática é inédita na literatura, e pode constituir-se em uma

alternativa no desenvolvimento de novas terapias para micobacterioses, incluindo a tuberculose.

CYNAMON *et al.* (1995) propuseram a síntese dos ésteres do ácido pirazinóico através da reação de alcoólise do cloreto de pirazinoíla. Na preparação do cloreto de pirazinoíla com cloreto de tionila, os pesquisadores obtiveram rendimentos de 70 a 80%, e na etapa de alcoólise, 60 a 90%. No final das duas etapas, o rendimento efetivo ficou em torno de 50%.

Embora alguns métodos de preparação dos ésteres do ácido pirazinóico tenham se mostrado viáveis, poucos dos ésteres obtidos com rendimentos significativos servem de intermediários na obtenção dos pró-fármacos mútuos com as quinolonas. Dentre eles, apenas a síntese do pirazinoato de 2-cloroetila foi viável, num método adaptado de CYNAMON & KLEMENS (1992), porém com a vantagem de ser realizado em apenas uma etapa de reação, e produzindo rendimento de 90% (figura 26). Observou-se que o ácido pirazinóico apresentou boa solubilidade no 2-cloroetanol, o que tornou viável a utilização deste reagente como o próprio solvente da reação. Os dados espectroscópicos e análise elementar mostraram que o pirazinoato de 2-cloroetila (7) desejado foi obtido e isolado com alto grau de pureza.

Outro método encontrado na literatura para preparar os ésteres do ácido pirazinóico é a esterificação pela reação com DCC e uma base, geralmente DMAP (SEITZ, SULING, REINOLDS, 2002). Este método é amplamente utilizado, mas traz rendimentos variáveis e dá origem a subprodutos indesejáveis, como dicicloexiluréia, difícil de ser retirado, e *N*-aciluréias (MARCH, 1992). O método foi utilizado na tentativa de obter o pirazinoato de 2-hidroxietila (3), mas o rendimento foi baixo e não foi possível separar a mistura obtida no final do procedimento experimental (figura 23).

O terceiro método que pode ser utilizado na obtenção de ésteres do ácido pirazinóico é a esterificação pela reação de carboxilatos com haletos de alquila, através de substituição nucleofílica (MARCH, 1992; ONO *et al.*, 1978), podendo ser feita também por catálise de transferência de fases. A reação ocorre através do mecanismo de SN_2 (MARCH, 1992). Com este método, obtiveram-se alguns ésteres

do ácido pirazinóico, como o pirazinoato de etila (10) e o pirazinoato de hexila (13), com rendimentos que variaram de 48 a 78%, semelhante aos rendimentos obtidos no método proposto por CYNAMON e cols. (1995), mas também com a vantagem de ser feito em apenas uma etapa de reação.

Observou-se que outros solventes também são capazes de dissolver o ácido pirazinóico a quente, como MeCN e DMF, principalmente após a adição de uma base, como TEA. Como a utilização do 2-cloroetanol como reagente não se mostrou uma boa alternativa sintética, optou-se por substituí-lo na obtenção dos pirazinoatos. Isto pelo fato das reações de substituição nucleofílica do grupo cloreto do 2-cloroetanol pelo ácido pirazinóico ou pelas quinolonas não mostrarem viabilidade, o que é possível de entender já que o cloreto não é um grupo de saída tão bom comparando-se com brometo ou iodeto. Isso foi demonstrado quando se observou a viabilidade deste tipo de reação com brometo de etila, brometo de hexila e 1,3-dibromopropano (figuras 28 a 37). Utilizando-se os dois primeiros, mesmo com bases diferentes, a reação apresentou rendimentos que possibilitaram o isolamento e identificação dos ésteres.

Com 1,3-dibromopropano, a reação pareceu produzir alguns produtos, avaliando-se por CCD. Entretanto, os dois grandes problemas encontrados nos experimentos foram controlar a duplicação do ácido pirazinóico e isolar os produtos obtidos. Todos os esforços foram dispensados na obtenção do pirazinoato de 3-bromopropila (15) em quantidade e com pureza desejáveis para as próximas etapas, já que o objetivo era obter um éster do ácido pirazinóico com um ponto reativo para a esterificação das quinolonas. Porém, sempre se produziu uma grande quantidade do produto duplicado dipirazinoato de 1,3-propanodiila (16). Nenhum desses produtos foi isolado.

A utilização de 2-bromoetanol ou 3-bromopropanol como reagentes foi, a partir daí, estudada como possibilidade para a viabilidade da síntese do pró-fármaco recíproco, já que isto resolveria o problema da seletividade de reação, embora estes reagentes tenham custo elevado e sejam de difícil síntese. Como tentativa, planejou-se a síntese do 2-bromoetanol a partir do etilenoglicol com PBr_3 , e então os esforços se direcionaram neste sentido.

Contudo, com base nos conhecimentos adquiridos durante os experimentos, é desejável que a síntese do pró-fármaco recíproco utilizando como reagente o 2-bromoetanol inicie-se pela esterificação do grupo carboxila da quinolona através de reação de substituição nucleofílica, para conseqüentemente utilizar o grupo hidroxila na reação com o cloreto de pirazinoíla. Este procedimento pode ser racionalizado analisando-se a estrutura molecular das quinolonas, que dificultariam a formação de cloreto de acila por possuírem outros grupos que poderiam reagir com o cloreto de tionila, por exemplo, o grupo amino piperazínico. Embora se encontre na literatura que o melhor método para a preparação de cloretos de acila é a reação com cloreto de tionila, por produzir baixas quantidades de subprodutos, mesmo com outros grupos funcionais presentes na molécula (MARCH, 1992), o grupo amino, com pequenas quantidades de água no ambiente reacional, pode reagir com o cloreto de tionila através de uma neutralização, ou ainda o mesmo pode reagir com o cloreto de acila formado, produzindo uma amida, principalmente na esterificação do ciprofloxacino, que possui o grupo amino piperazínico secundário, mais reativo.

As sínteses do pirazinoato de etila e do pirazinoato de hexila foram feitas com alguns objetivos: obter pró-fármacos do ácido pirazínico que possam apresentar boa atividade tuberculostática; avaliar a influência da cadeia lateral do éster na atividade biológica e, posteriormente, aplicar esses dados em estudos de modelagem molecular e QSAR; otimizar a síntese de outros ésteres, principalmente dos intermediários utilizados na obtenção do pró-fármaco recíproco proposto neste trabalho. A otimização dos processos de síntese foi avaliada variando alguns fatores em dois níveis, entre eles a base utilizada na reação (TEA, DBU e carbonatos), quantidade dos reagentes, influência do solvente (DMF e acetonitrila) e a influência da temperatura.

A base utilizada na geração dos carboxilatos pode variar, e podem-se destacar como as mais utilizadas na literatura a TEA, DBU e carbonatos, como o carbonato de sódio (esquemas 29 a 37). De maneira geral, observa-se melhores rendimentos utilizando-se bases orgânicas, embora a utilização de carboxilatos, previamente preparados, também proporcionou bons rendimentos e formação de menor quantidade de subprodutos.

Entre as bases orgânicas utilizadas, tanto DBU quanto TEA apresentaram resultados semelhantes, porém, a TEA apresenta vantagens nas etapas de purificação, pois como possui ponto de ebulição muito menor que o DBU, a TEA pode ser facilmente evaporada sob pressão reduzida. Segundo ONO e cols. (1978), o DBU apresenta a vantagem de formar complexo mais solúvel com o ácido orgânico do que a TEA, em solventes bastante apolares, como benzeno. Como o ácido pirazinóico apresenta maior solubilidade em solventes polares, optou-se por utilizar DMF e acetonitrila para as reações e, portanto, este fato não se mostra vantajoso nos métodos aqui utilizados.

Alguns autores questionaram a importância do DBU nas reações de esterificação (ONO *et al.*, 1978; SHIEH, DELL, REPIC, 2002), por terem obtido rendimentos altos com essa base em comparação com outras bases orgânicas estericamente impedidas. Foi então proposto que o DBU atua como catalisador em algumas reações (AGGARWAI & MEREEU, 1999; SHIEH, DELL, REPIC, 2002), incluindo esterificações. Nos experimentos realizados neste trabalho, esta propriedade não foi observada, como se pode constatar nos resultados. MERKER & SCOTT (1961) demonstraram que reações de esterificação com haletos de alquila e TEA levam longos tempos de reação e necessitam de altas temperaturas (aproximadamente 150 °C), provavelmente pela menor solubilidade do complexo formado por ligações de hidrogênio entre TEA e o ácido carboxílico em benzeno (ONO *et al.*, 1978). Neste trabalho, observa-se que a reatividade dessas bases em acetonitrila e DMF é semelhante.

A utilização do carbonato de sódio como base gerou menores rendimentos, provavelmente pela sua menor solubilidade nos solventes utilizados e, conseqüentemente, menor formação do íon carboxilato.

O principal empecilho encontrado na síntese dos ésteres do ofloxacino foi a baixa solubilidade deste fármaco em solventes orgânicos usuais. Testes de solubilidade realizados mostraram boa solubilidade somente em acetonitrila, dioxano e DMF, todos a temperaturas superiores a 60°C. Por conta disto, todas as reações tentadas com o ofloxacino se deram nestes solventes, e a temperaturas elevadas.

MAEDA *et al.* (1993) relataram a síntese do éster pivaloiloximetílico do ofloxacino, como o objetivo de avaliar a biodisponibilidade do fármaco após a administração concomitante de antiácidos contendo alumínio. A síntese se procedeu utilizando clorometilpivalato e carbonato de potássio anidro, com 88% de rendimento. O Rf encontrado para o éster obtido foi 0,47, utilizando como fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ (15:5:2:1), e para o ofloxacino, 0,31. O método foi adaptado neste trabalho, porém, sem obter rendimento que permitisse o isolamento do composto resultante. A avaliação por CCD mostrou que houve produtos formados, porém, a maior parte deles apresentou Rf inferior ao do composto de partida. ERTAN *et al.* (1992) sintetizaram alguns ésteres do ofloxacino, sendo que a avaliação por CCD mostrou que todos os compostos apresentaram Rf em torno de 0,75, e 0,39 para o ofloxacino, com fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (45:15:3).

Mesmo utilizando-se outros métodos, com os mesmos brometos de alquila como agentes alquilantes, observa-se que a reação não acontece com facilidade. A monitoração da reação por CCD continuou mostrando a formação de algum composto que apresenta Rf mais baixo que o do ofloxacino, algo improvável para a formação de um éster, já que outros autores relataram Rf superiores para vários ésteres do ofloxacino em relação ao fármaco (ERTAN *et al.*, 1992; MAEDA *et al.*, 1993). Isto nos permite aventar a hipótese de que o grupo amino terciário da piperazina está sendo alquilado, formando um sal de amônio, ou que se forma um éster duplo do ofloxacino quando se utiliza 1,3-dibromopropano, que pode apresentar Rf inferior ao do fármaco (figura 71). Para evitar a duplicação indesejável, utilizou-se excesso do alquilante (cerca de 10 vezes). Mesmo assim, nota-se a formação do produto de Rf inferior, porém, algo se forma que possui Rf superior, em quantidade muito pequena.

Figura 71: Possíveis produtos formados na reação entre ofloxacino e 1,3-dibromopropano.

ERTAN e cols. sintetizaram ésteres do ofloxacino com o objetivo de melhorar as propriedades farmacocinéticas e a atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando como agentes alquilantes diferentes cloretos de alquila, e procedendo com a reação à temperatura ambiente, conseguindo rendimentos em torno de 61%. Curiosamente, os procedimentos realizados nesse trabalho, utilizando temperatura mais elevada (em torno de 60°C) e brometos como alquilantes não ocorreu de maneira conveniente, sempre se observando a formação de produto com Rf inferior ao do composto de partida.

Na reação com 2-bromoetanol, observa-se no ambiente reacional após o desenvolvimento cromatográfico por CCD a formação da mesma mancha de baixo Rf. Depois de findado o tempo de reação, isolou-se o precipitado formado e procedeu-se às análises espectroscópicas de infravermelho, RMN de carbono, hidrogênio e correlação heteronuclear (tabela 5). A análise desses dados sugere que este precipitado é o éster 2-hidroxietílico do ofloxacino (20), precipitado este que não se forma em ambiente reacional que usa DMF como solvente, por provavelmente encontrar-se solúvel neste. Portanto, prefere-se utilizar, para esta reação, acetonitrila como solvente por facilitar o isolamento do produto.

A possibilidade da hidroxila da carboxila do fármaco formar uma ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila cetônica presente no anel quinolônico (figura 72) também deve ser considerada como problema para a reação de

esterificação da quinolona, já que esta interação aumenta a energia de ativação da carboxila para a reação, e também reduz a acidez do hidrogênio carboxílico, diminuindo assim a reatividade deste grupo. Estudos de modelagem molecular, com o objetivo de avaliar a estabilidade dessa ligação de hidrogênio e, conseqüentemente, avaliar a reatividade da carboxila, podem certamente ser considerados como ferramenta de auxílio.

Figura 72: Formação de ligação de hidrogênio intramolecular no ofloxacino.

Embora o ciprofloxacino apresente solubilidade bem inferior ao ofloxacino, as tentativas de esterificação mostraram-se mais promissoras. A reação de esterificação do ciprofloxacino com 1,3-dibromopropano, mesmo não tendo todos os dados espectroscópicos para a elucidação da estrutura, aparentemente ocorreu. Após desenvolvimento cromatográfico de CCD, com fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (45:15:3), observou-se R_f para o produto isolado (25) foi de aproximadamente 0,75, sendo o do ciprofloxacino cerca de 0,4, o que traz indícios da formação de um composto mais lipofílico, podendo ser o éster desejado (figura 46). A banda de 1722cm^{-1} no espectro de infravermelho traz forte indício da formação do éster, já que no espectro do ciprofloxacino esta banda mostra-se ausente.

Foram utilizadas bases diferentes nas tentativas de esterificação do ciprofloxacino, a exemplo dos ésteres do ácido pirazinóico, objetivando-se a otimização da síntese. O método que apresentou resultados mais promissores foi o que se utilizou carbonato de potássio como base. Da mesma forma que ocorre com o ofloxacino, também há a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio no ciprofloxacino. Porém, isto se transforma em um problema maior quando se observa que no ciprofloxacino a amina terminal da piperazina é secundária, e não terciária, podendo constituir um nucleófilo mais forte e, conseqüentemente, estando mais sujeita a alquilação pelo haleto orgânico utilizado.

Para a preparação dos pró-fármacos mútuos 27 e 28, efetuaram-se duas tentativas de síntese por substituição nucleofílica (figuras 50 e 52) e uma tentativa por catálise por transferência de fases (figura 51). No método ilustrado no esquema 38, verificou-se através de CCD que houve a formação de produtos, embora a quantidade de subprodutos fosse grande. Porém, as quantidades obtidas não permitiram o isolamento e análise destes.

Da mesma forma que em situações anteriores, observa-se que o cloreto de alquila, neste momento, o pirazinoato de 2-cloroetila (7), não constitui um bom reagente para a preparação do éster da quinolona, pelo cloro não ser um bom grupo de saída. Observa-se por CCD que a reação se procede, porém, com rendimentos muito pequenos para conseguir o isolamento do produto. Portanto, a utilização de pirazinoato de 2-bromoetila seria mais adequada para obter o pró-fármaco mútuo 27 (figura 67).

Na reação de substituição nucleofílica do 1,3-dibromopropano (figura 52), não se obteve o resultado desejado, provavelmente pela formação de éster duplo do ácido pirazinóico (figura 61) no primeiro passo da reação. Este método foi então descartado, concentrando-se na obtenção dos ésteres de cada fármaco primeiramente, e sua purificação, para depois prosseguir com a preparação dos pró-fármacos mútuos.

As reações apresentadas nos esquemas das figuras 27 e 53 são chamadas classicamente de reações de Finkelstein (MARCH, 1992), onde é possível trocar o halogênio do haleto de alquila pela reação com sal inorgânico de halogeneto de sódio ou potássio.

A reação baseia-se no fato de que sais do ânion iodeto são mais solúveis em acetona que os do ânion brometo, que por sua vez, são mais solúveis do que os do ânion cloreto, e também no fato da ligação halogênio-carbono ser mais instável quanto melhor o grupo de saída. A substituição ocorre via SN_2 , já que bases fracas são bons nucleófilos. Quando a reação ocorre, o cloreto insolúvel precipita no meio.

Embora a reação de Finkelstein ocorra geralmente com bons rendimentos (MARCH, 1992), as nossas tentativas não tiveram sucesso, provavelmente pela presença de água nos reagentes. A água pode interferir na reação porque esta se constitui um nucleófilo forte. Além disso, é difícil acompanhar o desenvolvimento da reação, pois os reagentes não aparecem na placa de CCD revelada por luz ultravioleta.

A preparação do bromoetanol foi realizada com sucesso. A reação costuma produzir bons rendimentos, e inclusive o rendimento obtido poderia ser melhor. Porém, como o composto de partida é um diálcool, poderia produzir maior quantidade de dibromoetano se maiores quantidades de PBr_3 fossem utilizadas. A reação a partir do etilenoglicol poderia ter sido feita com outros reagentes, por exemplo, com HBr . Embora o HBr seja um reagente mais barato que PBr_3 , este último produz melhores rendimentos (MARCH, 1992).

Os resultados obtidos no ensaio biológico mostram um aumento de atividade significativa do ácido pirazinóico para seu derivado éster, sendo que este mostra CIM comparável ao do ciprofloxacino, utilizado no tratamento de tuberculose multi-resistente e outras micobacterioses (tabela 6). Este aumento de atividade era previsto (CYNAMON *et al.*, 1995), porém, não havia dados de CIM deste composto frente *M. tuberculosis* H37Rv.

KUSHNER *et al.* (1955) avaliou a atividade de tiopirazinoatos e verificou que alguns desses compostos, em particular, isopropil-tiopirazinoato, apresentaram atividade antimicobacteriana. Porém, o pesquisador atribuiu a atividade à liberação da etil-mercaptana, e não ao ácido pirazinóico. O primeiro indício que ésteres do ácido pirazinóico teriam atividade antimicobacteriana apareceu no trabalho de SOLOMONS & SPOERRI (1953), quando buscavam atividade anestésica local em ésteres do ácido pirazinóico e do ácido 2,3-pirazinodióico.

Observa-se experimentalmente que a pirazinamida apresenta melhor atividade *in vitro* em pH ácido (CYNAMON & KLEMENS, 1992; SEITZ, SULING, REYNOLDS, 2002). Foi verificado que a atividade aumenta conforme o pH diminui, sendo que a atividade ideal ocorre no meio com pH aproximadamente 5,8

(CYNAMON & KLEMENS, 1992; CYNAMON *et al.*, 1995). Não é possível verificar a atividade em pH menor, já que a micobactéria não cresce em pH inferior a 5,6.

Encontra-se descrito na literatura que a CIM do pirazinoato de 2-cloroetila 7 é de 6,25µg/ml em pH 5,8 para *M. bovis* ATCC27289 e para *M. tuberculosis* BUR (CYNAMON & KLEMENS, 1992), sendo que o *M. bovis* é naturalmente resistente à pirazinamida. Os autores não realizaram ensaios de CIM para o composto em *M. tuberculosis* H37Rv. Os compostos que apresentaram melhor atividade foram o pirazinoato de alila e o pirazinoato de *n*-propila, com CIM menor que 3,25µg/ml. Em outro trabalho, CYNAMON *et al.* (1995) obtiveram CIM menor que 2µg/ml para quatro compostos, pirazinoato de isobutila, pirazinoato de *n*-decila, pirazinoato de *n*-pentadecila e pirazinoato de benzila.

No ensaio realizado neste trabalho, obteve-se CIM de 3,96µg/ml em pH 7,0 para *M. tuberculosis* H37Rv, cepa resistente à pirazinamida. Pode-se então inferir que o pirazinoato de 2-cloroetila deve apresentar atividade aprimorada em pH 5,8 e, comparando-se com outros compostos descritos na literatura, é um composto com boa atividade. Observa-se um aumento na atividade dos ésteres do ácido pirazinóico de 2 a 8 vezes quando se diminui o pH do meio de 6,6 para 5,8 (CYNAMON & KLEMENS, 1992), portanto, estima-se que a atividade do pirazinoato de 2-cloroetila pode ser de pelo menos 1,625µg/ml.

Conclui-se a partir dos resultados obtidos que ésteres do ácido pirazinóico constituem-se uma possibilidade real de planejamento de pró-fármacos com atividade tuberculostática, sendo que o pirazinoato de 2-cloroetila é um composto de boa atividade em comparação com outros compostos relatados na literatura.

Conclui-se também que é possível sintetizar ésteres do ácido pirazinóico por vários métodos diferentes, sendo a reação de substituição de brometos de alquila com carboxilatos um método a ser considerado, pela facilidade de síntese e pelos rendimentos obtidos em comparação com os métodos utilizados comumente na literatura.

O planejamento de pró-fármacos recíprocos de fluorquinolonas tuberculostáticas e ácido pirazinóico ainda merece atenção e, provavelmente, será uma boa alternativa para se obter boa atividade tuberculostática e também para conseguir simplificar o tratamento longo atualmente utilizado. Deve-se, para tal, desenvolver métodos de preparação que possibilitem a preparação com viabilidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANGADEN, G.J.; LERNER, S.A. The clinical use of fluoroquinolones for the treatment of mycobacterial diseases. *Clinical Infectious Diseases*, v.25, n.5, p.1213-1221, 1997.

ALVIREZ-FREITES, E.J.; CARTER, J.L.; CYNAMON, M.H. *In vitro* and *in vivo* activities of gatifloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, p.1022-1025, 2002.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Preventive treatment of tuberculosis. *American Review of Respiratory Disease*, v.104, p.460-463, 1971.

ANDRIOLE, V.T., eds. *The quinolones*. New York: Academic Press, 1988. 262p.

ANDRIOLE, V.T. The future of quinolones. *Drugs*, v.45, suppl.3, p.1-7, 1993.

ARORA, S.K. Correlation of structure and activity in ansamycins: structure, conformation and interactions of antibiotic rifamycin S. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.28, p.1099-1102, 1985.

BAKER, W.R.; MISTCHER, L.A.; ARAIN, T.M.; SHAWAR, R.; STOVER, C.K. Recent advances in the chemistry and biology of antimycobacterial agents. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, v.31, p.161-170, 1996.

BAKER, W.R.; CAI, S.; DIMITROFF, M.; FANG, L.; HUH, K.K.; RYCKMAN, D.R.; SHANG, X.; SHAWAR, R.M.; THERRIEN, J.H. A prodrug approach toward the development of water soluble fluoroquinolones and structure-activity relationships of quinoline-3-carboxylic acids. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.47, p.4693-4709, 2004.

BARNES, P.F.; BLOCK, A.B.; DAVIDSON, P.T. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*, v.324, p.1645-1650, 1991.

BARRY, C.E.; SLAYDEN, R.A.; SAMPSON, A.E.; LEE, R.E. Use of genomics and combinatorial chemistry in the development of new antimycobacterial drugs. *Biochemical Pharmacology*, v.59, n.3, p.221-231, 2000.

BAULARD, A.R.; BETTS, J.C.; ENGOHANG-NDONG, J.; QUAN, S.; McADAM, R.A.; BRENNAN, P.J.; LOCHT, C.; BESRA, G.S. Activation of pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, v.275, n.36, p.28326-28331, 2000.

BERETTA, A.L.R.Z. *Estudo comparativo de dois métodos para determinar a sensibilidade de Mycobacterium tuberculosis frente aos quimioterápicos*. Rio Claro,

1997. 134p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências do Campus Rio Claro - Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho".

BELANGER, A.E.; BESRA, G.S.; FORD, M.E.; MIKOSOVÁ, K.; BELISLE, J.T.; BRENNAN, P.J.; INAMINE, J.M. The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.93, n.21, p.11919-11924, 1996.

BLANCHARD, J.S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annual Review of Biochemistry*, v.65, p.215-239, 1996.

BLONDEAU, J.M. The role of fluoroquinolones in skin structure infections. *American Journal of Clinical Dermatology*, v.3, n.1, p.37-46, 2002.

BLOOM, B.R., ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington: ASM Press, 1994. p.3-11, 47, 59, 485-501.

BODOR, N.; FARAG, H.; BREWSTER, M.E. Site-specific, sustained release of drugs to the brain. *Science*, v.214, p.1370-1372, 1981.

BOUVIER, E.; THIROT, S.; SCHIMIDT, F.; MONNERET, C. First enzymatically activated taxotere prodrugs designed for ADEPT and PMT. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.12, p.969-977, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas da Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Manual técnico para o controle da tuberculose*. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 64p. (Série A. Normas e manuais técnicos, n.148).

BREWSTER, M.E.; ANDERSON, W.R.; WEBB, A.I.; PABLO, L.M.; MEINSMA, D.; MORENO, D.; DERENDORF, H.; BODOR, N.; POP, E. Evaluation of brain-targeting zidovudine chemical delivery system in dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.41, n.1, p.122-128, 1997.

BRITISH THORACIC SOCIETY. Control and prevention of tuberculosis in the United Kingdom: code of practice 2000. *Thorax*, v.55, p.887-901, 2000.

BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs of the Future*, v.16, n.5, p.443-456, 1991.

CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. O processo da latência no planejamento de fármacos. *Química Nova*, v.22, n.1, p.75-84, 1999.

CLARK, J.H.; EMSLEY, J.; HOYTE, O.P.A. Reactions of carboxylic acids with dichloro- and dibromo-alkanes in the presence of fluoride ions: effects of very strong hydrogen bonding. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry*, v.9, p.1091-1094, 1977.

CLEMENS, D.L. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Trends in Microbiology*, v.4, n.3, p.113-118, 1996.

COBELENS, F.G.J.; DEUTEKOM, H.V.; DRAAYER-JANSEN, I.W.E. Risk of infection with *Mycobacterium tuberculosis* in travelers to areas of high tuberculosis endemicity. *Lancet*, v.356, p.461-465, 2000.

COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C.E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; McLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, v.393, p.537-544, 1998.

CYNAMON, M.H.; GIMI, R.; GYENES, F.; SHARPE, C.A.; BERGMANN, K.E.; HAN, H.J.; GREGOR, L.B.; RAPOLU, R.; LUCIANO, G.; WELCH, J.T. Pyrazinoic acid esters with broad spectrum *in vitro* antimycobacterial activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.38, p.3902-3907, 1995.

CYNAMON, M.H.; KLEMENS, S.P. Antimycobacterial activity of a series of pyrazinoic acid esters. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.35, p.1212-1215, 1992.

DALCOLMO, M.P. AIDS e tuberculose: novo problema, velho problema. *Jornal de Pneumologia*, v.26, n.2, 2000. [Editorial].

DIAZ, J.C.R.; RUIZ, M.; ROYO, L.G. *In vitro* activity of new fluoroquinolones and linezolid against nontuberculous mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.47, p.416-417, 2003.

DOBIAS, J.; UHER, M.; KOREŇOVÁ, A.; BRŤKO, J.; BELICOVÁ, A.; FOLTÍNOVÁ, P.; EBRINGER, L. N-succinimidyl ester of ofloxacin: a novel prodrug. *Pharmazie*, v.50, p.563, 1995.

DOLEZAL, M.; MILETIN, M.; KUNES, J.; KRALOVA, K. Substituted amides of pyrazine-2-carboxylic acids: synthesis and biological activity. *Molecules*, v.7, p.363-373, 2002.

DONG, Y.; XU, C.; ZHAO, X.; DOMAGALA, J.; DRLICA, K. Fluoroquinolone action against Mycobacteria: effects of C-8 substituents on growth, survival, and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.42, n.11, p.2978-2984, 1998.

DRLICA, K.; XU, C.; WANG, J.Y.; BURGER, R.M.; MALIK, M. Fluoroquinolone action in mycobacteria: similarity with effects in *Escherichia coli* and detection by cell lysate viscosity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.40, n.7, p.1594-1599, 1996.

DROBNIIEWSKI, F.A.; POZNIAK, A.L.; UTTLEY, A.H. Tuberculosis and AIDS. *Journal of Medical Microbiology*, v.43, n.2, p.85-91, 1995.

EVANS, J. TB: Know your enemy. 2000. Disponível em: <http://www.chemsoc.org/gateway/chembyte/cib/evans.htm>. Acesso em: 22 ago. 2004.

FELDER, E.; TIEPOLO, V.; MENGASSINI, A. Method for the esterification of carboxylic acids in gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography, A*, v.82, n.2, p.291-296, 1973.

FEREBEE, S.H.; MOUTH, F.W. Tuberculosis morbidity in a controlled trial of the prophylactic use of isoniazid among household contact. *American Review of Respiratory Disease*, v.85, p.490-510, 1962.

FINKEN, M.; KIRSCHNER, P.; MEIER, A.; WREDE, A.; BOTTGER, E.C. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Molecular Microbiology*, v.9, n.6, p.1239-1246, 1993.

FOX, H.H.; GIBAS, J.T. Synthetic tuberculostatics: pyridine carboxylic acid hydrazides and benzoic acid hydrazides. *Journal of Organic Chemistry*, v.20, p.1653-1660, 1952.

FRANZBLAU, S.G.; WHITE, K.E. Comparative *in vitro* activities of 20 fluoroquinolones against *Mycobacterium leprae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.34, n.2, p.229-231, 1990.

FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; McLAUGHLIN, J.C.; TORRES, P.; FUENTES, P.; COOK, M.B.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M.T.; QUENZER, V.K.; FERGUSON, R.M.; SHEEN, P.; GILMAN, R.H. Rapid, low-technology MIC determination with Clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.2, p.362-366, 1998.

GILLESPIE, S.H.; BILLINGTON, O. Activity of moxifloxacin against mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.44, p.393-395, 1999.

GBAYISOMORE, A.; LARDIZABAL, A.A.; REICHMAN, L.B. Update: prevention and treatment of tuberculosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.13, p.155-159, 2000.

GEORGIEVA, N.; GADJEVA, V. Isonicotinoylhydrazone analogs of isoniazid: relationship between superoxide scavenging and tuberculostatic activities. *Biochemistry (Moscow)*, v.67, n.5, p.588-591, 2002.

GONZALBES, R.; BRUN-PASCAUD, M.; GARCIA-DOMENECH, R.; GALVEZ, J.; GIRADD, P.M.; DOUCET, J.P.; DERUIN, F. Prediction of quinolone activity against *Mycobacterium avium* by molecular topology and virtual computational screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, n.10, p.2764-2770, 2000.

GRANGE, J.M. Immunophysiology and immunopathology of tuberculosis. In: DAVIES, P.D.O., ed. *Clinical tuberculosis*. 2.ed. London: Chapman & Hall, 1998. p.129-152.

GUILLEMIN, I.; CANBAU, E.; JARLIE, V. Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus *Mycobacterium* phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.39, n.9, p.2145-2149, 1995.

HAEMERS, A.; LEYSEN, D.C.; BOLLAERT, W.; ZHANG, M.; PATTYN, S.R. Influence of N substitution on antimycobacterial activity of ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.34, n.3, p.496-497, 1990.

HOLÝ, A.; VOTRUBA, I.; MASOJÍDKOVÁ, M.; ANDREI, G.; SNOECK, G.; NAESENS, L.; DE CLERCQ, E.; BALZARINI, J. 6-[2-(phosphonometoxy)alkoxy]pyrimidines with antiviral activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.45, n.9, p.1918-1929, 2002.

HORSBURGH Jr., C.R. The pathophysiology of disseminated *Mycobacterium avium* complex disease in AIDS. *Journal of Infectious Diseases*, v.179, n.3, p.S461-S465, 1999.

ISEMAN, M.D. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, v.329, p.784-791, 1993.

JACOBS, M.R. Activity of quinolones against mycobacteria. *Drugs*, v.58, suppl.2, p.19-22, 1999.

JAGIRDAR, J.; ZAGAZG, D. Pathology and insights into pathogenesis of tuberculosis. In: ROM, W.N.; GARAY, S.M.; BLOOM, B.R., eds. *Tuberculosis*. Boston: Little, Brown, 1996. p.467-482.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. *Microbiologia médica*. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1974. p.190-202.

JENSEN, N.P.; FRIEDMAN, J.J.; KROPP, H.; KAHAN, F.M. Use of acetylacetone to prepare a prodrug of cycloserine. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.23, n.1, p.6-8, 1980.

KAUFMANN, S.H.E. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Natural Medicines*, v.6, n.9, p.955-960, 2000.

KAUR, D.; VERMA, I.; KHULLET G.K. Biochemical effects of spafloxacin on cell envelope of mycobacteria. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, v.38, n.4, p.235-240, 2001.

KAWAKAMI, K.; NAMBA, K.; TANAKA, M. MATSUHASHI, N.; SATO, K.; TAKEMURA, M. Antimycobacterial activities of novel levofloxacin analogues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, n.8, p.2126-2129, 2000.

KIKUCHI, S.; RAINWATER, D.L.; KOLATTUKUDY, P.E. Purification and characterization of an usually large fatty acid synthase, from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.295, p.318-326, 1992.

KLOPMAN, G.; FERCU, D.; LI, J.Y.; ROSENKRANZ, H.S.; JACOBS, M.R. Antimycobacterial quinolones: a comparative analysis of structure-activity and structure-cytotoxicity relationships. *Research in Microbiology*, v.147, p.86-96, 1996.

KLOPMAN, G.; FERCU, D.; RENAULT, T.E.; JACOBS, M.R. N-1-tert-butyl-substituted quinolones: *in vitro* anti-*Mycobacterium avium* activities and structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, n.11, p.2637-2643, 1996.

KLOPMAN, G.; LI, J.Y.; WANG, S.; PEARSON, A.J.; CHANG, K.; JACOBS, M.R.; BAJAKSOUZIAN, S.; ELLNER, J. *In vitro* anti-*Mycobacterium avium* activities of quinolones: predicted active structures and mechanistic considerations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.38, p.1794-1802, 1994.

KOLATTUKUDY, P.E.; FERNANDES, N.D.; AZAD, A.K.; FITZMAURICE, A.M.; SIRAKOVA, A.T. Biochemistry and molecular genetic of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Molecular Microbiology*, v.24, p.263-270, 1997.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL Jr., V.R.; SOMMERS, H.M. *Diagnóstico laboratorial de microbiologia: texto e atlas colorido*. 2.ed. São Paulo: Médica Panamericana, 1989. p.452-483.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. *Química farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. p.39-83.

KRENITSKY, T.A.; HALL, W.W.; DE MIRANDA, P.; BEAUCHAMP, L.M.; SCHAEFFER, H.J.; WHITEMAN, P.D. Deoxyacyclovir: a xantine oxidase-activated prodrug of acyclovir. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.31, p.3209-3213, 1984.

KUSHNER, S.; DALALIAN, H.; BACH Jr., F.L.; CENTOLA, D.; SANJURJO, J.L.; WILLIAMS, J.H. Experimental chemotherapy of tuberculosis. III. Ethyl mercaptan and related compounds in tuberculosis. *Journal of the American Chemical Society*, v.77, p.1152-1155, 1955.

LEE, R.E.; MIKUŠOVÁ, K.; BRENNAN, P.J.; BESRA, G.S. Synthesis of th mycobacterial arabinose donor β -D-arabinofuranosyl-1-monophosphoryldecaprenol, desenvolvimento de a basic arabinosyl-transferase inhibitor. *Journal of the American Chemical Society*, v.117, p.11829-11832, 1995.

LEITE, O.H.M. Tuberculose. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. *Diagnóstico laboratorial: avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. p.221-229.

LEMKE, T.L. Antimycobacterial agents In: WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L., eds. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p.904-923.

LIFSON, A.R. *Mycobacterium tuberculosis* infection in travelers: tuberculosis comes home. *Lancet*, n.356, n.9228, p.442-443, 2000.

LONG, E.G.; BIRKNESS, K.A.; NEWMAN, G.W.; QUINN, F.D.; EWING Jr., E.P.; BARTLETT, J.H.; KING, C.H.; YAKRUS, M.A.; HORSBURGH Jr., C.R. Model for pathogenesis of *Mycobacterium avium*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.797, p.255-256, 1996.

MAEDA, Y.; OMODA, K.; KONISHI, T.; TAKAHASHI, M.; KIHIRA, K.; HIBINO, S.; TSUKIAL, S. Effects of aluminium-containing antacid on bioavailability of ofloxacin following oral administration of pivaloyloxymethyl ester of ofloxacin as prodrug. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.16, n.6, p.594-599, 1993.

MANDELL, G.L.; PETRI Jr., W.A. Fármacos usados na quimioterapia da tuberculose, da doença pelo complexo *Mycobacterium avium* e da lepra. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E., MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W., eds. *Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica*. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p.849-863.

MARCH, J. *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure*. New York: John Wiley, 1992. 1495p.

McNEIL, M.R.; BRENNAN, P.J. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Research in Microbiology*, v.142, p.451-463, 1991.

MENGER, F.M.; ROURK, M.J. Synthesis and reactivity of 5-fluorouracil/cytarabine mutual prodrugs. *Journal of Organic Chemistry*, v.62, p.9083-9088, 1997.

MERCK. The MERCK Manuals. The MERCK Manual – Second Home Edition. Infections. *Tuberculosis*. Disponível em: <http://www.merck.com/mmhe/sec17/ch193/ch193a.html>. Acesso em: 02 ago. 2005.

MINNIKIN, D.E. Chemical principles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelope. *Research in Microbiology*, v.142, p.419-481, 1991.

MITCHISON, D.A. The garrod lecture: understanding the chemotherapy of tuberculosis: current problems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.29, p.477-493, 1992.

MITSCHER, L.A. Antibiotics and antimicrobial agents. In: WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L., eds. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p.819-866.

NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angewandte Chemie, International Edition in English*, v.17, n.7, p.522-523, 1978.

ONO, N.; YAMADA, T.; SAITO, T.; TANAKA, K.; KAJI, A. A convenient procedure for esterification of carboxylic acids. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v.51, n.8, p.2401-2404, 1978.

ONODERA, Y.; TANAKA, M.; SATO, K. Inhibitory activity of quinolones against DNA gyrase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.47, p.447-450, 2001.

ORENSTEIN, J.M.; FOX, C.; WAHL, S.M. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science*, v.276, p.1857-1861, 1997.

PAN AMERICAN HEALTH ASSOCIATION. *Tuberculosis fact sheet 2004, Americas*, 2004. Disponível em: <http://www.paho.com>. Acesso em: 02 ago. 2005.

PANDEYA, S.N.; SRIRAM, D.; NATH, G.; DE CLERCQ, E. Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities of norfloxacin Mannich bases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.35, n.2, p.249-255, 2000.

PANDEYA, S.N.; SRIRAM, D.; YOGEE SWARI, P.; ANANTHAN, S. Antituberculous activity of norfloxacin mannich bases with isatin derivatives. *Chemotherapy*, v.47, n.4, p.266-269, 2001.

PELOQUIN, C.A.; MCPHEE, A.A.; BERNING, S.E. Malabsorption of antimycobacterial medications. *New England Journal of Medicine*, v.329, p.1122-1123, 1993.

PIDDOCK, L.J.; RICCI, V. Accumulation of five fluoroquinolones by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.48, n.6, p.787-791, 2001.

PINEDA, N.I.S.; PEREIRA, S.M.; MATOS, E.D.; BARRETO, M.L. Quimioprofilaxia na prevenção da tuberculose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.30, n.4, p.485-495, 2004.

POOLE, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-positive bacteria and the Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, n.10, p.2595-2599 2000.

PRIMM, T.P.; LUCERO, C.A.; FALKINHAM III, J.O. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, v.17, p.98-106, 2004.

QUINN, F.D.; NEWMAN, G.W.; KING, C.H. Virulence determinants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.215, p.131-156, 1996.

RAGNO, R.; MARSHALL, G.R.; SANTO, R.D.; COSTI, R.; MASSA, S.; ROMPEI, R.; ARTICO, M. Antimycobacterial pyrroles: synthesis, anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity and QSAR studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.8, p.1423-1432, 2000.

RAJA, A. Immunology of tuberculosis. *Indian Journal of Medical Research*, v.120, p.213-232, 2004.

RANDO, D.G.; SATO, D.N.; SIQUEIRA, L.; MALVEZZI, A.; LEITE, C.Q.F.; AMARAL, A.T.; FERREIRA, E.I.; TAVARES, L.C. Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid[(5-nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.10, p.557-560, 2002.

REED, S.; LOBET, Y. Tuberculosis vaccine development: from mouse to man. *Microbes and Infection*, v.7, p.922-931, 2005.

RENAU, T.E.; SANCHEZ, J.P.; GAGE, J.W.; DEVER, J.A.; SHAPIRO, M.A.; GRACHECH, S.J.; DOMAGALA, J.M. Structure activity relationships of the quinolone antibacterials against mycobacteria: effect of structural changes at N-1 and C-7. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.39, p.729-735, 1996.

RENAU, T.E.; SANCHEZ, J.P.; SHAPIRO, M.A.; DEVER, J.A.; GRACHECK, S.J.; DOMAGALA, J.M. Effect of lipophilicity at N-1 on activity of fluoroquinolones against mycobacteria. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.38, p.2974-2977, 1995.

REYNOLDS, R.C.; BANSAL, N.; ROSE, J.; FRIEDRICH, J.; SULING, W.J.; MADDRY, J.A. Ethambutol-sugar hybrids as potential inhibitors of mycobacterial cell-wall biosynthesis. *Carbohydrate Research*, v.317, n.1/4, p.164-179, 1999.

RILEY, L.W. Drug-resistant tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, v.17, n.2, p.442-446, 1993.

ROSS, D.L.; ELKINTON, S.K.; RILEY, C.M. Physicochemical properties of the fluoroquinolone antibacterials. III. 1-octanol/water partition coefficients and their relationships to structure. *International Journal of Pharmaceutics*, v.88, n.1/3, p.379-389, 1992.

ROUHI, A.M. Tuberculosis: a tough adversary. *Chemical & Engineering News*, v.77, n.20, p.52-59, 1999.

RUFFINO NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, n.1, p.51-58, 2002.

SAMUELSON, J. Doenças infecciosas. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T., eds. *Robbins patologia estrutural e funcional*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. p.298-360.

SÃO PAULO (Estado). Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Doenças Crônicas Transmissíveis. Tuberculose. *Divisão de Controle da Tuberculose*. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose/>. Acesso em: 02 ago. 2005.

SEITZ, L.E.; SULING, W.J.; REYNOLDS, R.C. Synthesis and antimycobacterial activity of pyrazine and quinoxaline derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.45, p.5604-5606, 2002

SENSI, P.; GRASSI, G.G. Antimycobacterial agents. In: BURGER, A.; WOLFF, M.E., ed. *Burger's medicinal chemistry and drug discovery*. New York: John Wiley, 1996. v.2, p.575-636.

SEPKOWITZ, K.A.; RAFFALLI, J.; RILEY, L. Tuberculosis in the AIDS era. *Clinical Microbiology Reviews*, v.8, n.2, p.180-199, 1995.

SEGIN, G.P.; MANZI, S.F.; PACHECO, R. New trends in the drug therapy of localized and disseminated *Mycobacterium avium* complex infection. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v.53, n.21, p.2585-2590, 1996.

SHAW, J.E.; KUNERTH, D.C.; SHERRY, J.J. A simple quantitative method for the esterification of carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*, n.9, p.689-692, 1973.

SILNA, P.E.A.; BIGI, F.; SANTANGELO, M.P.; ROMANO, M.I. MARTIN, C.; CATALDI, A.; AINSAL, J.A. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, n.3, p.800-804, 2001.

SILVA, M.; FERREIRA, E.I. Situação atual da quimioterapia contra a tuberculose. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.35, n.1, p.17-30, 1999.

SIMON, E.; VERES, E.; BANKI, G. Changes in SGOT activity during treatment with ethionamide. *Scandinavian Journal of Respiratory Diseases*, v.50, p.314-322, 1969.

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, v.16, p.463-496, 2003.

SNIDER Jr., D.E. Pyridoxine supplementation during isoniazid therapy. *Tubercle*, v.61, p.191-196, 1980.

SOLOMONS, I.A.; SPOERRI, P.E. Esters of pyrazinoic and pyrazine-2,3-dicarboxylic acids. *Journal of the American Chemical Society*, v.75, p.679-681, 1953.

SOMMERS, H.M.; GOOD, R.C. *Mycobacterium*. In: LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W.J., eds. *Manual of clinical microbiology*. 4.ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985. p.216-248.

SOUZA, M.V.N.; VASCONCELOS, T.R.A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. *Química Nova*, v.28, n.4, p.678-682, 2005.

STENGER, S.; MAZZACCARO, R.J.; UYEMURA, K.; CHO, S.; BARNES, P.F.; ROSAT, J.P.; SETTE, A.; BRENNER, M.B.; PORCELLI, S.A.; BLOOM, B.R.; MODLIN, R.L. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*, v.276, n.5319, p.1684-1687, 1997.

SUNA, J.; SAKAIA, S.; TAUCHIA, Y.; DEGUCHIA, Y.; CHENB, J.; ZHANGB, R. Determination of lipophilicity of two quinolone antibacterials, ciprofloxacin and grepafloxacin, in the protonation equilibrium. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.54, n.1, p.51-58, 2002.

TAKACS-NOVAK, K.; JOZAN, M.; HERMECZ, I.; SZASZ, G. Lipophilicity of antibacterial fluoroquinolones. *International Journal of Pharmaceutics*, v.79, n.2/3, p.86-89, 1992.

TAKAYAMA, K.; KILBURN, J.O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.33, p.1493-1499, 1989.

THOMPSON, L.T.; MOSKAL, J.R.; DISTERHOFT, J.F. Hippocampus-dependent learning facilitated by a monoclonal antibody or D-cycloserine. *Nature*, v.359, n.6396, p.638-641, 1992.

TILLOTSON, G.S. Quinolones: structure-activity relationships and future prediction. *Journal of Medical Microbiology*, v.44, p.320-324, 1996.

TOMIOKA, H. Expectation of new antituberculous drugs and targeting therapy for treatment of mycobacterial infections. *Kekkaku*, v.68, n.11, p.723-730, 1993.

TOMIOKA, H.; SATO, K.; AKAKI, T.; KAJITANI, H.; KAWAHARA, S.; SAKATANI, M. Comparative *in vitro* antimicrobial activities of the newly synthesized quinolone HSR-903, sitafloxacin (Du-6859a), gatifloxacin (Am-1155), and levofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, n.12, p.3001-3004, 1999.

TOMIOKA, H.; SATO, K.; KAJITANI, H.; AKAKI, T.; SHISHIDO, S. Comparative antimicrobial activities of the newly synthesized quinolone WQ-3034, levofloxacin, sparfloxacin, and ciprofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, p.283-286, 2000.

WANG, Y.; YUAN, H.; WRIGHT, S.C.; WANG, H.; LARRICK, J.W. Synthesis and preliminary cytotoxicity study of a cephalosporin-CC-1065 analogue prodrug. *BMC Chemical Biology*, v.1, p.1-4, 2001.

WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: WERMUTH, C.G., ed. *The practice of medicinal chemistry*. London: Academic Press, 1996. p.697-716.

WERMUTH, M.C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: JOLLES, G.; WOOLDRIDGE, K.R.H., eds. *Drug design: fact or fantasy?* London: Academic Press, 1984. P.47-72. (Based on the proceedings of the third Rhône-Poulenc Round Table Conference entitled "Drug design: fact or fantasy?").

WOLFSON, J.S.; HOOPER, D.C. The fluorquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.28, n.4, p.581-586, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Sites. Tuberculosis (TB). TB Publications. 2004. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. (WHO Report, 2004). Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2004/en/. Acesso em: 02 ago. 2005.

YEW, W.W.; PIDDOCK, L.J.; LI, M.S.; LYON, D.; CHAN, C.Y.; CHENG, A.F. *In vitro* activity of quinolones and macrolides against mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.34, p.343-351, 1994.

ZIMHONY, O.; COX, J.S.; WELCH, J.T.; VILCHEZE, C.; JACOBS Jr., W.R. Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Natural Medicines*, v.6, n.9, p.1043-1047, 2000.

Anexo I: Espectro de infravermelho do pirazinato de 2-cloroetila (7).

Anexo II: Espectro de ^1H -RMN do pirazinoato de 2-cloroetila (7).

Anexo III: Espectro de ^{13}C -RMN do pirazinoato de 2-cloroetila (7).

Anexo IV: Espectro de infravermelho do pirazinoato de etila (10).

Anexo V: Espectro de ^1H -RMN do pirazinoato de etila (10).

Anexo VI: Espectro de ^{13}C -RMN do pirazinoato de etila (10).

Anexo VII: Espectro de infravermelho do pirazinoato de hexila (13).

Anexo VIII: Espectro de ^1H -RMN do pirazinoato de hexila (13).

Anexo IX: Espectro de ^{13}C -RMN do pirazinoato de hexila (13).

Anexo X: Espectro de infravermelho do éster 2-hidroxietílico do ofloxacino (20).

Anexo XI: Espectro de ^1H -RMN do éster 2-hidroxietílico do ofloxacino (20).

Anexo XII: Espectro de ^{13}C -RMN do éster 2-hidroxietílico do ofloxacino (20).

Anexo XIII: Espectro de correlação heteronuclear ^1H -RMN x ^{13}C -RMN do éster 2-hidroxiétilico do ofloxacino (20).

Anexo XIV: Espectro de infravermelho do éster 3-bromopropílico do ciprofloxacino (25).

Anexo XV: Espectro de ^1H -RMN do 2-bromoetanol (21).

Anexo XVI: Espectro de ^{13}C -RMN do 2-bromoetanol (21).