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

Quimioterápicos potencialmente ativos em endemias tropicais e
tuberculose: estudos de QSAR na série de 5-nitroderivados
benzidrazídicos e o planejamento de pró-fármacos de ação
prolongada

Daniela Gonçalves Rando

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Titular. Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2005

18.269

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011164

Ficha Catalográfica

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

Rando, Daniela Gonçalves

R192q Quimioterápicos potencialmente ativos em endemias tropicais
e tuberculose : estudos de QSAR na série de 5-nitroderivados
benzidrazídicos e o planejamento de pró-fármacos de ação
prolongada / Daniela Gonçalves Rando. -- São Paulo, 2005.
1v. (Várias paginações)

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne

1. Relações quantitativas entre estrutura química e atividade
biológica : Química farmacêutica 2. Latenciação : Química
farmacêutica 3. Fármaco : Síntese : Química farmacêutica
I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

615.19 CDD

Daniela Gonçalves Rando

“Quimioterápicos potencialmente ativos em endemias tropicais e tuberculose: estudos de QSAR na série de 5-nitroderivados benzidrazídicos e o planejamento de pró-fármacos de ação prolongada”

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Titular Elizabeth Igne Ferreira
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 16/05/05 de ____.

Para

Meus pais

Leyde Gonçalves Rando

e

Valdomiro Gonçalves Rando

*... a amizade personificada,
o cuidado paternal,
o carinho maternal,
o amor quase divino....*

*em instantes em que tudo parecia perdido,
em vocês encontrei força, apoio, vontade e
condições para continuar minha jornada...
Que dupla vocês fazem!!!*

*Meu irmão, Paulo, e minha cunhada, Leia,
não só pelo apoio incondicional durante todo
o trabalho, mas por me presentear,em,
neste período, com duas preciosidades:
Ana Carolina e Gabriela!*

*Minha tia Olga Gonsales de Oliveira (in memorian)
Pelo apoio durante toda a minha formação e por
acreditar tanto em mim. Você partiu sem poder
ver esta tese completa, mas sempre acreditou nela.
Para você tia...*

À Beth,

*"A glória da amizade não é a mão estendida,
nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia.
É a inspiração espiritual que vem quando você descobre
que alguém acredita e confia em você."*

- Ralph Waldo Emerson

Obrigado por acreditar e confiar em mim!

Aos amigos

Aos que passam

*Cada um que passa em nossa vida passa sozinho...
Porque cada pessoa é única para nós,
e nenhuma substitui a outra.
Cada um que passa em nossa vida passa sozinho,
mas não vai só...
Levam um pouco de nós mesmos
e nos deixam um pouco de si mesmos.
Há os que levam muito,
mas não há os que não levam nada.
Há os que deixam muito,
mas não há os que não deixam nada.
Esta é a mais bela realidade da vida...
A prova tremenda de que cada um é importante
e que ninguém se aproxima do outro por acaso...*

(Antoine de Saint Exupéry)

Agradecimentos

Este trabalho deve muito a várias pessoas e instituições. Eu gostaria de agradecer especialmente:

- ❖ A Deus, fonte única de força e inspiração;*
- ❖ À minha orientadora Professora Titular Elizabeth Igne Ferreira, por compartilhar comigo seus temas de pesquisa, por me oferecer orientação irrestrita, por ouvir com interesse e ânimo todas as minhas dúvidas e idéias e, acima de tudo, pela “maternidade” a mim dedicada durante todo este período. Muito do que sou hoje como profissional e pessoa devo a você. Muito obrigado!*
- ❖ Aos professores doutores Leoberto Costa Tavares, Carlos Alberto Brandt, Antônio Tavares do Amaral, Hugo Kubinyi, Maria Amélia Barata da Silveira pelas dicas profissionais, pelas discussões de trabalho e pelo apoio nas mais diversas situações. Meus sinceros agradecimentos;*
- ❖ Ao Prof. Dr. Mitchel A. Avery por ter me acolhido em seu laboratório e me dado a oportunidade de conhecer, não só novas formas de pesquisa, mas também novas culturas. Thank you, Dr. Avery!*
- ❖ Aos professores doutores Dayse Nakamura Sato, Clarice Queico Fujimura Leite, André Tempone, Sérgio Albuquerque, Babu Lal Tekwani, Shabana Khan, Scott Franzblau pela ajuda com os ensaios biológicos realizados no Brasil e nos Estados Unidos;*
- ❖ Aos doutores Mauro Aquiles LaScalea e Carla Menezes por tantas dúvidas sanadas ao final deste trabalho;*
- ❖ À amiga Prof^a Dr^a. Maria Luiza Cruz pelas oportunidades de contato com o mundo acadêmico por meio de suas “bancas” que muito acrescentaram na minha formação;*
- ❖ Ao Prof. Dr. José Agustin Quincoces Suarez, pelas oportunidades de pesquisa e acadêmica, e por me liberar para finalizar este trabalho;*
- ❖ À amiga Claudete Justina Valduga por ter me ajudado a dar meus primeiros passos no mundo da pesquisa;*
- ❖ Aos amigos Paulo Batista de Carvalho e sua esposa Ester por terem sido minha família durante minha estada nos Estados Unidos e pelo carinho que sempre dedicaram a mim;*

- ❖ *Às amigas Kátia Solange, Nara Ricelli e Michelle Polli pelas altas conversas, pelas deliciosas risadas e pelo companheirismo e lealdade sempre demonstrado mesmo em momentos muito difíceis! Obrigado por tornarem meus dias de laboratório muito mais alegres;*
- ❖ *Ao amigo Remo Trigoni Junior, companheiro de tantas horas, felizes e tristes e por não ter me deixado desistir jamais;*
- ❖ *Aos amigos de laboratório nos Estados Unidos: Cássia Mizuno, Nakul Telang, Seoung Reoung Shoi, Amar Chittiboyina e Blake Watkins pela ajuda na pesquisa e com a língua inglesa;*
- ❖ *Aos técnicos Charles de Lima Brito, Kátia Cilene Botelho e Maria Inês de Almeida Gonçalves pela amizade e pelo auxílio constante;*
- ❖ *Aos colegas de laboratório no Brasil - em ordem alfabética – Cláudia, Guilherme, Gustavo, Hélio, Jeanine, Juliana, Priscila e Vanesca pelos bons momentos passados juntos;*
- ❖ *Aos “vizinhos” de laboratório: Ana Cláudia, André Gabriel, Camila, Diogo, Iguatemi e Roberto;*
- ❖ *Aos funcionários Beth, Celi, Suzy, Jorge e Elaine pela ajuda com a parte burocrática deste trabalho;*
- ❖ *À FAPESP e à CAPES pelas bolsas concedidas no período;*
- ❖ *À minha família pela compreensão nas constantes ausências;*
- ❖ *Aos que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração desta tese.*

A todos agradeço profundamente e dedico o resultado deste trabalho.

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.*

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Malária, doença de Chagas e leishmaniose, consideradas doenças negligenciadas, e tuberculose, infecção bacteriana reemergente, que grassa em diversas regiões do mundo, constituem-se grandes desafios médico-sociais para os países acometidos. Nitroderivados são substâncias utilizadas na terapêutica como antimicrobianos de amplo espectro. O mecanismo de ação proposto para estes compostos engloba a redução do grupo nitro por nitrorredutases inespecíficas, levando à produção de radicais livres. Estes, altamente reativos, reagiriam, por sua vez, com macromoléculas, organelas, membranas e mesmo ácidos nucleicos danificando-os irreversivelmente e levando o microrganismo – bactérias e parasitos – à morte. No caso particular da doença de Chagas, a redutase envolvida na redução seria a *tripanotiona redutase*, que poderia ser inibida por estes compostos. Compostos 5-nitro-2-heterocíclicos benzidrazídicos são derivados estudados como antibacterianos e antiparasitários. Sabe-se que alterações na posição 2 dos anéis 5-nitrofurânicos interferem com o potencial redox do grupo nitro e, assim, com a atividade biológica destes compostos. Com base nesta informação e supondo que a estrutura destas moléculas seja completamente ressonante, propôs-se a síntese de série de derivados 5-nitro-heterocíclicos benzidrazídicos variando-se a estrutura dos análogos em dois pontos principais: substituições no anel benzênico da estrutura e o tipo de anel heterocíclico ligado diretamente ao grupo nitro. Com relação ao tipo de anel ligado ao grupo nitro foram propostos derivados 5-nitrofurânicos e 5-nitrotiofênicos. Quanto aos substituintes no anel benzênico propuseram-se derivados mono e dissustituídos nas posições *meta* e *para* de acordo com suas contribuições eletrônicas e hidrofóbicas para o sistema. Para tanto foram utilizados os parâmetros físico-químicos π e σ . Para analisar o efeito das modificações na atividade biológica destes compostos aplicou-se a metodologia de Topliss como ponto de partida para a análise quantitativa, QSAR-2D, pelo método misto de Hansch-Free Wilson. A biblioteca planejada foi obtida por síntese paralela em solução, empregando-se sintetizadores paralelos automatizados. Foram obtidos 56 derivados, que foram purificados, caracterizados estruturalmente e, então, analisados frente a quatro microrganismos: *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Mycobacterium tuberculosis*. Os estudos de QSAR-2D revelaram importância significativa do tipo de anel heterocíclico ligado ao grupo nitro para a atividade destes compostos. Não foi possível, entretanto, obter correlação das atividades com as substituições realizadas no anel aromático, o que levou ao arrolamento de diferentes hipóteses, incluindo aquelas relativas à deslocalização eletrônica nas estruturas estudadas. Estas hipóteses, bem como os resultados sobre a influência do tipo de anel heterocíclico ligado ao grupo nitro nas atividades biológicas estudadas fornecem subsídios para novos projetos de pesquisa dedicados à exploração das informações obtidas neste trabalho.

SUMMARY

Malaria, Chagas' disease and leishmaniasis, considered as neglected diseases, and tuberculosis, reemerging bacterial infection disseminated worldwide, are medical-social challenges for the countries involved. Nitroderivatives are therapeutic compounds used as broad spectrum antimicrobial drugs. The most accepted mechanism of action of these compounds is based on nitro group reduction by unspecific nitroreductases or, in case of Chagas' disease, inhibition of *tripanotione reductase*. Free radical species are formed from this reduction, which can react with macromolecules, organelles, membranes and nucleic acids of microorganisms leading them to death. The 5-nitro-2-heterocyclic benzhydrazide derivatives are nitrofurans analogs that have been tested as antibacterial and antiprotozoal drugs. As already known, modifications in position 2 of 5-nitroheterocyclic rings can interfere with nitro group redox potential and then with their biological activities. Based on this information and considering these compound structures are completely conjugated structures, we suggested the synthesis of a library of 5-nitro-2-heterocyclic benzhydrazide derivatives with two main points of structural modification: the substituents in benzenic ring and the kind of heterocyclic ring directly linked to the nitro group. The former was achieved by suggesting mono and disubstituted analogs based on their hydrophobic and electronic contributions whose values were obtained from physico-chemical parameters π and σ . Nitrofurans and nitrothiophenes were elected to study the influence of the heterocyclic ring directly linked to the nitro group. Topliss methodology was used as a starting point to 2D-QSAR mixed quantitative method through Hansch-Free Wilson analysis. The designed library was synthesized by solution phase parallel synthesis using automated parallel synthesizers. Fifty-six analogs were synthesized, purified, characterized and biologically analyzed against four microorganisms: *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Mycobacterium tuberculosis*. The 2D-QSAR studies provided information about the significative influence of the kind of heterocyclic ring on the biological activity of the series. Nevertheless, it was not possible to obtain information about the influence of different substitutions on benzene ring and different hypothesis were advanced to explain the electronic distribution in the structures herein studied. These hypotheses as well as the data about the influence of the kind of heterocyclic ring directly linked to the nitro group on the biological activities studied deserve to be tested and explored in future researches.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. TUBERCULOSE	3
2.1.1. Micobactéria	3
2.1.2. Transmissão	5
2.1.3. Bases moleculares	6
2.1.4. Patologia	7
2.1.5. Tratamento	8
2.1.6. Epidemiologia	13
2.2. MALÁRIA	16
2.2.1 Etiologia e Transmissão	16
2.2.2. Mecanismos invasivos	20
2.2.2.1 <i>Fase pré-eritrocítica</i>	20
2.2.2.2. <i>Fase eritrocítica</i>	21
2.2.3. Patologia	22
2.2.4. Tratamento	23
2.2.5. Epidemiologia	25
2.3. LEISHMANIOSE	27
2.3.1. Etiologia e Transmissão	27
2.3.2. Sobrevivência no lisossomo	30
2.3.3. Patogenia	32
2.3.3.1. <i>Leishmaniose visceral</i>	33
2.3.3.2. <i>Leishmaniose mucocutânea</i>	34
2.3.3.3. <i>Leishmaniose cutânea</i>	35
2.3.4. Tratamento	36
2.3.5. Epidemiologia	38
2.4. DOENÇA DE CHAGAS	40
2.4.1. Etiologia e Transmissão	40
2.4.2. Mecanismos invasivos	43

2.4.3. Patogenia	44
2.4.4. Tratamento	45
2.4.5. Epidemiologia	46
2.5. INTRODUÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS POR MEIO DE OTIMIZAÇÃO DE PROTÓTIPOS	48
2.5.1. Metodologia de Topliss	50
2.5.2. Relação estrutura química e atividade biológica quantitativa – QSAR	52
2.5.2.1. <i>Tratamento estatístico</i>	54
2.5.2.2. <i>Parâmetros utilizados em QSAR-2D</i>	56
2.5.2.2.1 <i>Parâmetros de lipofilicidade</i>	57
2.5.2.2.2 <i>Parâmetros de polarizabilidade</i>	58
2.5.2.2.3 <i>Parâmetros eletrônicos</i>	58
2.5.2.2.4 <i>Parâmetros estéricos</i>	58
2.5.2.2.5 <i>Outros parâmetros</i>	58
2.4.2.3. <i>Relações não lineares entre estrutura química e atividade biológica</i>	59
2.4.2.4. <i>Obtenção dos modelos de QSAR-2D</i>	60
2.6. SÍNTESE PARALELA	62
2.7. COMPOSTOS NITRO-HETEROCÍCLICOS	66
III. OBJETIVOS	69
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	71
4.1. MATERIAIS	71
4.1.1. Reagentes	71
4.1.2. Solventes	72
4.1.3. Solventes deuterados	73
4.1.4. Parasitos	73
4.1.5. Meios de Cultura	73
4.1.6. Equipamentos	73
4.2. MÉTODOS	74
4.2.1. Síntese dos nitroderivados	74
4.2.1.1. <i>Etapla 1: Esterificação</i>	74

4.2.1.2. <i>Etapa 2: Preparação de hidrazidas</i>	75
4.2.1.3. <i>Etapa 3: Obtenção dos produtos finais</i>	75
4.2.2. <i>Análise estrutural dos compostos obtidos</i>	76
4.2.3. <i>Métodos de Purificação</i>	77
4.2.3.1. <i>Solventes</i>	77
4.2.3.2. <i>Produtos Finais e intermediários sintéticos</i>	77
4.2.4. <i>Determinação de coeficientes de partição</i>	78
4.2.4.1. <i>Preparo e estabilização da coluna cromatográfica</i>	78
4.2.4.1.1. <u><i>Coluna cromatográfica</i></u>	78
4.2.4.1.2. <u><i>Saturação da fase estacionária com n-octanol</i></u>	78
4.2.4.1.3. <u><i>Estabilização da coluna</i></u>	78
4.2.4.2. <i>Padronização do sistema de partição</i>	79
4.2.4.3. <i>Determinação dos valores de coeficiente de partição, $\log P_{HPLC}$</i>	80
4.2.5. <i>Ensaio Biológicos</i>	80
4.2.5.1. <i>Leishmaniose</i>	80
4.2.5.1.1. <u><i>Parasitas utilizados</i></u>	81
4.2.5.1.2. <u><i>Metodologia</i></u>	81
4.2.5.2. <i>Malária</i>	81
4.2.5.2.1. <u><i>Cepas de Plasmodium falciparum</i></u>	81
4.2.5.2.2. <u><i>Metodologia</i></u>	82
4.2.5.3. <i>Tuberculose</i>	83
4.2.5.3.1. <u><i>Microdiluição em placas</i></u>	83
4.2.5.3.2. <u><i>Green Fluorescent Protein Microplate Assay</i></u>	85
4.2.5.4. <i>Doença de Chagas</i>	86
4.2.6. <i>Estudos de QSAR</i>	87
V. RESULTADOS E DISCUSSÕES	89
5.1. PARTE 1: METODOLOGIA DE TOPLISS	89
5.2. PARTE 2: SÍNTESE PARALELA E ESTUDOS DE QSAR	98
5.2.1. <i>Planejamento da biblioteca</i>	98
5.2.1.1. <i>Escolha dos análogos</i>	98
5.2.1.2. <i>Estudos de correlação entre estrutura-química e atividade biológica (QSAR)</i>	101

5.2.2. Síntese Paralela	102
5.2.3. Ensaios Biológicos	117
5.2.3.1. <i>Leishmaniose</i>	117
5.2.3.2. <i>Malária</i>	119
5.2.3.3. <i>Tuberculose</i>	123
5.2.3.4. <i>Doença de Chagas</i>	125
5.2.4. Estudos de QSAR	126
5.2.4.1. <i>Leishmaniose</i>	127
5.2.4.1.1. <u><i>Nitrofurânicos</i></u>	134
5.2.4.1.2. <u><i>Nitrotiofênicos</i></u>	135
5.2.4.2. <i>Malária, Tuberculose e Doença de Chagas</i>	136
5.2.5. Discussões dos ensaios de QSAR-2D	137
5.2.5.1. <i>Modificações de substituintes no anel benzênico da estrutura</i>	137
5.2.5.2. <i>Tipo de anel heterocíclico diretamente ligado ao grupo nitro</i>	140
5.2.6. Análise qualitativa das relações entre a estrutura e as atividades antileishmania, antimalárica e antimicobacteriana	140
5.2.7. Outros estudos preliminares	142
5.2.7.1. <i>QSAR-2D</i>	142
5.4.4.2. <i>QSAR-3D dos derivados com atividade antileishmania</i>	143
VI. CONCLUSÕES	147
VII. PERSPECTIVAS	149
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
APÊNDICE A	
APÊNDICE B	

I. INTRODUÇÃO

As endemias tropicais representam problema médico-social grave, sobretudo aos países do Terceiro Mundo, entre eles, o Brasil. Contudo, a pesquisa para o desenvolvimento de novos medicamentos no combate às doenças tropicais é considerada parcela de mercado de pouco interesse por parte das empresas estrangeiras, normalmente sediadas em países nos quais estas endemias não são encontradas.

A despeito de, não raro, o problema poder ser solucionado por meio de medidas de saneamento básico, há necessidade de se desenvolverem, em paralelo, quimioterápicos úteis para o tratamento dos indivíduos infectados.

Ainda hoje, as doenças tropicais vitimam milhões de pessoas nos países pobres. As principais endemias do Brasil são: malária, doença de Chagas, leishmaniose, esquistossomíase e hanseníase.

A malária é uma protozoose causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, registrando-se entre 1,5 e 2,7 milhões de mortes por ano, a maioria na África. Desses, 1 milhão corresponde a crianças menores de 5 anos de idade e inclui óbitos por associação com outras doenças. O número de casos clínicos por ano situa-se na faixa entre 300 a 500 milhões (WHO, 2000b).

A leishmaniose, condição patológica provocada pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania*, é, ainda hoje, doença de grande importância social e econômica, sendo, das parasitoses causadas por protozoários, provavelmente a segunda em importância, após a malária. Segundo relatórios da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998), em 1996, 88 países eram por ela afetados, com 12 milhões de pessoas infectadas e cerca de 350 milhões sob risco.

Descoberta em 1909, por Carlos Chagas, a tripanossomíase americana ou doença de Chagas é uma protozoose causada pelo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, presente apenas no continente americano (Brenner, 1989). Estima-se que de 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita e que ocorram, aproximadamente, 50.000 mortes causadas pela doença de Chagas a cada ano (WHO, 2000a).

Em paralelo às endemias tropicais, a tuberculose surge como grande desafio para as organizações mundiais e grupos de pesquisa relacionados à saúde. O último relatório liberado pela Organização Mundial de Saúde estima que, em 2000, ocorreram 8,7 milhões de novos casos, acima dos 8,4 milhões estimados em 1999. Este crescimento é devido, principalmente, ao aumento de 20% na incidência da doença nos países africanos mais afetados pela epidemia de HIV/AIDS. Se a situação presente continuar, 10,2 milhões de novos casos serão esperados em 2005, sendo a África o continente mais afetado (WHO, 2001).

Os tratamentos, tanto para as endemias tropicais quanto para a tuberculose, carecem de novas abordagens principalmente frente ao aparecimento de resistência ou multi-resistência de parasitos, ou microrganismos, no caso da tuberculose, aos principais quimioterápicos disponíveis.

Frente ao exposto, a procura por novos fármacos ou protótipos que possam ser explorados contra tais doenças torna-se prioritária, principalmente para os países acometidos por tais endemias.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. TUBERCULOSE

A tuberculose tem acompanhado o homem desde o início de sua história. Entretanto, seu impacto na morbidade e mortalidade tem variado amplamente no decorrer dos séculos. (Bloom, Murray, 1992).

Os aglomerados urbanos e a pobreza foram responsáveis pela epidemia na Europa no início do século XVII. Durante esta epidemia e subsequente espalhamento para outros continentes, a tuberculose causou mais mortes humanas que qualquer outra doença (Bloom, Murray, 1992).

A descoberta da estreptomicina, há cerca de 50 anos, iniciou uma nova era, na qual se previa que a erradicação da tuberculose seria alcançada mediante uso de tratamento farmacológico adequado (ACET, 1999). Nas duas décadas seguintes, a introdução de novos fármacos mais efetivos (como a isoniazida e a rifampicina) levou à diminuição gradual nos casos da doença e assumiu-se que o problema estaria solucionado.

Estes medicamentos, associados ao aumento generalizado dos padrões de saúde e higiene, causaram rápido declínio da tuberculose em muitos países industrializados.

Frente a este quadro, a percepção à tuberculose pela população geral, bem como pela comunidade médica de países industrializados, foi alterada: a tuberculose não mais era encarada como uma doença significativa.

Como resultado desta apatia, poucos agentes ativos contra a tuberculose foram introduzidos nos últimos 30 anos (Hudson *et al.*, 2003).

Entretanto, esta atitude contrasta amplamente com os dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998), os quais mostram situação de urgência internacional.

2.1.1. Micobactéria

A tuberculose pode ser definida como sendo uma doença infecto-contagiosa crônica, causada por micobactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*) (Nakamura, 1998). As micobactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, único representante da família Mycobacteriaceae, apresentam-se na forma de bacilos curvos ou retos, com 0,2 a 0,7 µm de largura por 1,0 a 10,0 µm de comprimento. São aeróbias e classificadas de acordo com seu tempo de crescimento, sendo consideradas de crescimento rápido, quando requerem menos de sete

dias para produzir colônias visíveis, e de crescimento lento, aquelas que requerem mais de sete dias para produzir as mesmas colônias, quando inoculadas em meios de cultura sólidos (Fätkenheuer *et al.*, 1999; Rattan, Kalia, Ahmad, 1998).

São organismos Gram-positivos de parede celular complexa, que atua como interface entre o parasita e o hospedeiro. Como nos demais microrganismos, esta parede celular é constituída de um esqueleto de peptidoglicano unido por ligações cruzadas. Entretanto, a principal diferença entre a parede celular micobacteriana e a usualmente observada nos demais microrganismos Gram-positivos é a presença de grande quantidade de moléculas lipídicas aderidas ou associadas ao esqueleto básico, que confere propriedade de resistência álcool-ácido (Besra, Brennan, 1997).

Estudos de microscopia eletrônica revelam uma parede celular constituída de três camadas. A mais interna, elétron densa e constituída, provavelmente, de peptidoglicano e seguida de uma camada elétron-transparente constituída de micolatos e arabinogalactamas. A camada mais externa forma uma cápsula ao redor do bacilo, é elétron-opaca e composta de polissacarídeos, principalmente lipoarabinomanana ou de uma combinação de manana, glicana e arabinomanana, várias proteínas e lipoproteínas. Esta estrutura altamente lipofílica rende às micobactérias resistência natural a muitos antibióticos, os quais são incapazes de penetrar esta barreira (Colston, 1996).

A organização geral da parede celular é representada na figura 1.

Figura 1. Representação esquemática da parede celular do *M. tuberculosis*.

LAM = lipoarabinomanana, LPS = lipopolissacarídeo.

Fonte: www.uct.ac.za/depts/mmi/lsteyn/cellwall.html, 1996.

Mesmo possuindo uma parede celular complexa, as micobactérias valem-se de canais protéicos, as porinas, pelos quais água e outros nutrientes passam para o interior do microrganismo.

Seu genoma já se encontra completamente estudado e consiste de um único cromossomo circular ao longo do qual encontram-se, intercalados, diferentes elementos extracromossômicos, tais como plasmídeos, fagos e epissomos (Philipp *et al.*, 1998).

Seus cromossomos são ricos em guanina e citosina (G+C), sendo que a maioria das micobactérias possui entre 60 e 67 mol por cem pares CG, comparado aos 49% apresentados pela *Escherichia coli* (Colston, 1996).

A Figura 2 mostra representação circular do genoma do *M. tuberculosis*, o qual possui 4.411.522 pb.

Figura 2. Representação circular do genoma do *M. tuberculosis*.
Fonte: The Institute for genomic research (<http://www.tigr.org>, 2000)

2.1.2. Transmissão

O bacilo é adquirido por meio da inalação de gotículas (aerossóis) expelidas pela tosse, espirro ou fala de indivíduos infectados. A infecção ocorre quando os microrganismos resistem à primeira linha de defesa das vias aéreas superiores e alcançam os alvéolos (Robbins, 1996).

2.1.3. Bases moleculares (Colston, 1996)

Patógenos intracelulares desenvolveram estratégias para subverter processos fundamentais em células eucarióticas afim de convertê-las, ou um de seus compartimentos, em locais seguros para seu desenvolvimento. Tais esquemas são particularmente sofisticados para patógenos capazes de infectar células fagocíticas, tais como o macrófago, como no caso do *M. tuberculosis*.

Os benefícios de se instalar em tais células compensam os riscos, uma vez que os macrófagos têm vida relativamente longa e oferecem meios de disseminação para patógenos aptos, não só a vencer os mecanismos microbicidas de tais células, mas também de manipular suas atividades de apresentação de antígenos e estimulação de liberação de citocinas.

Este é o caso do *M. tuberculosis*, que é capaz de infectar macrófagos alveolares e resistir por anos em seu interior, até que possa proliferar por ocasião da diminuição das defesas naturais do organismo.

O passo inicial da infecção dos macrófagos alveolares pelo *M. tuberculosis* ocorre por meio da fagocitose. Sabe-se que este processo envolve interação receptor-ligante. Receptores de complemento CR1, CR35, CR3 e CR4 além de receptores de manose podem estar envolvidos nesta interação. Entretanto, ainda não foram evidenciados quais tipos de ligantes micobacterianos estariam envolvidos no processo.

Micobactérias secretam ampla variedade de proteínas, algumas das quais possuem capacidade de se ligar à fibronectina (Aboud-Zeid *et al.*, 1991). Estas mesmas proteínas poderiam estar envolvidas no processo de invasão pelo bacilo da célula hospedeira por facilitar ligações receptor-ligante específicas.

Em processos fagocíticos normais, partículas inertes são retidas em um fagossomo, que, posteriormente, funde-se a lisossomas para formar estrutura conhecida como fagolisossoma. O *M. tuberculosis*, entretanto, possui a capacidade impedir esta fusão (Armstrong, Hart, 1971). Desta maneira, o microrganismo evita a exposição às enzimas líticas presentes neste compartimento, o que contribui para a sobrevivência do patógeno no interior da célula hospedeira.

Entretanto, esta não é a única estratégia utilizada para a sobrevivência no interior do macrófago. Sabe-se que as micobactérias se desenvolvem em vacúolos não-acidificados (Deretic *et al.*, 1997). Estas observações foram estendidas em pesquisas que demonstraram a exclusão de uma próton-ATPase da membrana dos vacúolos contendo bacilos (Sturgill *et al.*, 1994).

Em resposta à invasão pelos patógenos, os macrófagos produzem série de citocinas, tais como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , entre outras. Estas citocinas são responsáveis por muitas das manifestações clínicas da tuberculose, tais como febre (IL-1, TNF), sede (TNF) e necrose tecidual (TNF).

O estímulo de produção e liberação de muitas destas citocinas tem sido atribuído à lipoarabinomanana (LAM) presente na parede celular das micobactérias. Já foi descrita a capacidade da LAM de estimular a produção de TNF α (Roach *et al.*, 1993), de IL-2 (Zhang *et al.*, 1994), IL-8 (Zhang *et al.*, 1995), além de influenciar na expressão gênica do macrófago (Roach, 1993). Por esse fato, acredita-se ser a LAM um fator de virulência do *M. tuberculosis*.

Uma vez que, como visto, o processo de infecção por micobactérias envolve a regulação da expressão gênica de macrófagos, muitos grupos de pesquisas têm se empenhado em caracterizar tais eventos regulatórios. Esses estudos devem fornecer informações mais minuciosas sobre a interação célula-parasita durante o processo infeccioso, provendo novos alvos para a pesquisa de tuberculostáticos (Duncan, 1997; Barry, 1997).

2.1.4. Patologia

Uma vez no organismo, os bacilos podem determinar diferentes evoluções clínicas. A multiplicação das micobactérias pode restringir-se ao sítio original de infecção ou disseminar-se para outras partes do organismo por meio da linfa. Isto explica o caráter diverso das manifestações clínicas da tuberculose (Boutotte, 1993; Cremin, 1995). Têm-se, então, as tuberculoses pulmonar e extrapulmonar e a meningite tuberculosa. A infecção preferencial dos pulmões explica-se devido à alta concentração de oxigênio neste órgão (Cecil, 1980; Brolio, Lima, 1991; Robbins, 1996).

A evolução da moléstia depende da carga bacilífera, idade, do estado nutricional e condição imunológica do paciente, bem como estágio da detecção e tratamento (Orme, 1995).

Muitos indivíduos expostos ao bacilo não desenvolvem a doença ativa. Nestes, os bacilos são fagocitados por macrófagos alveolares, cujo meio interno pouco oxigenado e ácido limita a capacidade multiplicadora dos germes e, por conseguinte, a extensão das lesões cavitárias. Também, desenvolve-se em poucas semanas a resposta celular mediada por linfócitos e macrófagos, resultando na morte de muitos bacilos e na persistência de outros em estágio de latência indefinido (Rattan, Kalia, Ahmad, 1998).

Por outro lado, quando o sistema imune não consegue conter o desenvolvimento do bacilo, este se multiplica rapidamente, levando à doença ativa. Isto pode acontecer logo em seguida à infecção ou muitos anos após a mesma.

A doença se caracteriza pelo desenvolvimento de granulomas nos tecidos infectados. Tais granulomas são resultantes do estímulo da resposta imunológica do portador, que leva à destruição não só de muitos bacilos como também de células teciduais e do infiltrado fagocítico. Deste conjunto de reações resulta a formação do cáseo-sólido, cujo pH é neutro e a oxigenação baixa sendo, portanto, desfavorável ao desenvolvimento da população bacilar remanescente (Cecil, 1980; Bloom, Rook, 1994; Robbins, 1996).

A patogenia evolui com a expansão da necrose e com a liquefação do cáseo, promovida por hidrolases. O cáseo liquefeito pode ser drenado deixando uma lesão cavitária e fornecendo meio rico para a proliferação dos bacilos. A lesão cavitária pulmonar apresenta altas concentrações de oxigênio e pH neutro a alcalino, permitindo intensa proliferação das micobactérias. Desta forma, as pequenas lesões evoluem para as chamadas cavernas tuberculosas, que inflamam e sangram, resultando em hemoptise (tosse com sangue e pus), sintoma comum no paciente tuberculoso (Bloom, Murray, 1992).

Tosse crônica (mais de 21 dias), dor no tórax, febre, suor noturno, perda de peso de forma lenta e progressiva e anorexia são outros sintomas decorrentes da evolução dos processos infecciosos e inflamatórios (Bloom, Murray, 1992; The internet pathology laboratory, 1999).

2.1.5. Tratamento

Uma vez instalada a doença, o tratamento consiste basicamente na administração de associações de quimioterápicos, visando evitar o desenvolvimento de resistência aos fármacos pelo bacilo. A eficácia do tratamento está diretamente relacionada com sua duração e por isto o tratamento de tuberculose dura, no mínimo, 6 meses. A interrupção da quimioterapia logo após o desaparecimento dos sintomas é a principal causa do desenvolvimento de cepas resistentes (WHO, 1997; Iseman, 1999a; WHO, 2000a).

Os fármacos utilizados no tratamento da tuberculose podem ser divididos em duas grandes classes: os fármacos de primeira linha, como a isoniazida (INH), a pirazinamida (PZA), a rifampicina (RMP), o etambutol (BEM) e a estreptomicina (SM), e os de segunda linha, como o ácido aminossalicílico, etionamida (ETH) e a tioacetazona (Tabela I). Estes últimos podem ser incorporados ou se constituir nos substitutos dos agentes preferenciais, quando estes não se mostram eficazes, embora apresentem o inconveniente de ser, no geral, menos eficazes e mais tóxicos (WHO, 1991; Brausch, Bass, 1993; Musser, 1995).

Como mencionado anteriormente, são usados sob forma de associações ou esquemas terapêuticos, mas já existem cepas multi-resistentes (Humma, 1996; Mello, Afiune, 1993; Shimao, 1987).

Tabela I. Fármacos utilizados na terapêutica da tuberculose

Fármaco (Sigla/ Introdução)	Potência	Alvo molecular	Gene envolvido na resistência	Administração	Toxicidade	Custo
<i>Fármacos de primeira linha</i>						
Isoniazida (INH/ 1952)	++++	Síntese de ácidos micólicos	inhA katg	oral	baixa	baixo
Rifampicina (RMP/ 1965)	++++	RNA poli- merase	rpoB	oral	baixa	médio
Pirazinamida (PZA/ 1970)	+++	?	pncA	oral	baixa	médio
Estreptomicina (SM/ 1944)	+++	Proteínas ribossômicas	rpoL, rrs, strA, S12	Intramuscular	média	alto
Etambutol (BEM / 1968)	++	Síntese da parede celular	emb A, B & C	oral	baixa	médio
<i>Fármacos de segunda linha</i>						
Etionamida* (1966)	+++	?	?	oral	alta	médio
Canamicina/ Amicacina (1957)	+++	Proteínas ribossômicas	?	Intramuscular	média	alto
Ciclosserina (1955)	++	Síntese da parede celular	?	oral	alta	alto
Capreomicina (1967)	++	?	?	Intramuscular	média	alto
Tioacetazona (1950)	+	?	?	oral	média	baixo
Ácido <i>p</i> - aminossalicílico (PAS/ 1946)	+	Biossíntese de folato	?	oral	média	alto
Ofloxacino (1987)	++	DNA girase	gyr A & B	oral	baixa	alto

Adaptado de John Hopkins – Center for tuberculosis research
(http://www.hopkins-tb.org/drug/drug_1.shtml)

As tabelas de II a V mostram os esquemas terapêuticos para as várias formas de tuberculose (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 1999).

Tabela II. Esquema Terapêutico I: Tratamento de tuberculose pulmonar e extrapulmonar (exceto meningite)*

Fase (meses)	Fármaco	Peso do paciente e dose diária			
		Até 20 kg (mg/kg)	20 a 35 kg (mg)	35 a 45 kg (mg)	Acima de 45 kg (mg)
Primeira (dois)	RMP	10	300	450	600
	INH	10	200	300	400
	PZA	35	1000	1500	2000
Segunda (quatro)	RMP	10	300	450	600
	INH	10	200	300	400

*Em caso de portador de HIV ou com AIDS prolonga-se a administração deste esquema terapêutico por três meses.

Tabela III. Esquema Terapêutico IR*: Tratamento de casos de recidiva ou de reinício de tratamento, após abandono do Esquema I

Fase (meses)	Fármaco	Peso do paciente e dose diária			
		Até 20 kg (mg/kg)	20 a 35 kg (mg)	35 a 45 kg (mg)	Acima de 45 kg (mg)
Primeira (dois)	RMP	10	300	450	600
	INH	10	200	300	400
	PZA	35	1000	1500	2000
	EMB	25	600	800	1200
Segunda (quatro)	RMP	10	300	450	600
	INH	10	200	300	400
	EMB	25	600	800	1200

* Esquema IR = Esquema terapêutico I reforçado

Tabela IV. Esquema Terapêutico II: Tratamento de meningite tuberculosa*

Fase (meses)	Fármaco	Dose diária para todas as idades	
		(mg)	Dose Máxima (mg)
Primeira (dois)	RMP	20	600
	INH	10	400
	PZA	35	200
Segunda (sete)	RMP	10 a 20	600
	INH	10 a 20	400

*Em caso de acometimento de outros órgãos concomitantemente, recomenda-se o esquema para meningite. Recomenda-se o uso de corticóide quando houver complicações inflamatórias, em qualquer idade.

Tabela V. Esquema Terapêutico III: Tratamento de tuberculose em caso de falência dos esquemas I, IR e II

Fase (meses)	Fármaco	Peso do paciente e dose diária			
		Até 20 kg (mg)	20 a 35 kg (mg)	35 a 45 kg (mg)	Acima de 45 kg (mg)
Primeira (três)	SM	20	500	1000	1000
	ETH	12	250	500	750
	BEM	25	600	800	1200
	PZA	35	1000	1500	2000
Segunda (nove)	ETH	12	250	500	750
	EMB	25	600	800	1200

Na última década, a Organização Mundial de Saúde vem divulgando e estimulando a utilização de estratégia de detecção e cura para a tuberculose conhecida como DOTS (Directly Observed Treatment, Short-course) (WHO, 1992; WHO, 1998a). DOTS combina cinco elementos: serviços de microscopia, apoio político, abastecimento eficaz de fármacos, sistema

de monitoramento do paciente e observação direta do tratamento. Uma vez confirmada a doença por meio de microscopia de escarro, inicia-se o tratamento do paciente com um esquema terapêutico. Este paciente é monitorado por familiares, médicos ou mesmo voluntários treinados, que asseguram que o paciente tome os medicamentos nos horários corretos e pelo período exigido, evitando, assim, o abandono do tratamento logo após a melhora dos sintomas. Após dois meses, nova microscopia de escarro é realizada com o intuito de verificar o progresso do tratamento. Deve ser providenciado prontuário que relate e documente toda a evolução do quadro.

Para que este sistema funcione corretamente é necessário o apoio político e sistema de abastecimento de fármacos adequado, que evite a interrupção do tratamento por falta de medicamentos (WHO, 1998b). Outras estratégias preconizadas pela OMS são a utilização de fármacos de ação prolongada ou de esquemas terapêuticos, que diminuam o tempo necessário de tratamento, visando à diminuição do número de doses diárias e à baixa aceitação do tratamento pelo paciente (WHO, 1994; Yew, 1999).

Atualmente, reconhece-se a necessidade urgente de novos fármacos para o tratamento da tuberculose, especialmente agentes para uso em terapias de curta duração e no tratamento de infecções por cepas multi-resistentes e de doença latente.

Face a esta situação, diferentes associações têm sido criadas para alcançar estes objetivos, sendo a mais recente delas a chamada Aliança Global para Desenvolvimento de fármacos para a tuberculose (*Global Alliance for TB Drug Development*). Esta aliança é uma associação sem fins lucrativos para acelerar a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos tuberculostáticos, que reúne iniciativa pública e privada, sendo a Organização Mundial de Saúde um dos parceiros. Como primeiro resultado desta operação conjunta, foi realizada a compilação de agentes tuberculostáticos potenciais (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 2000). Estes dados são apresentados na tabela VI.

Tabela VI. Situação atual dos tuberculostáticos potenciais em pesquisa e desenvolvimento

Fase	Compostos
Descoberta	análogos da tiolactomicina
	análogos do etambutol
	análogos da mefloquina e da halofantrina
	diterpenóides
	9-benzilpurinas
	benzoxazinas
	imidazo(4,5-c)piridinas
	diazapteridinas
	triptantrina e análogos
	tetrametilpiperidino (TMP) fenazinas
	Derivados de isoniazida e análogos
	1,2,4-triazóis
	derivados de toluidina
Descoberta	fuleropirrolidinas
	granulisina
	estazima
	sacarídeos
	quinolonas
	oxazolidinonas
	análogos do miconazol
	nitroimidazóis
	imunomoduladores
	inibidores de bombas de efluxo
Desenvolvimento Pré-clínico	isocitrato liase
	quinolonas PD 161148 e CS-940
	calanolídeos
	nitroimidazóis
	poloxâmero 315 (CRL-1072)
	oxazolidinonas PNU 100480 e AZD 2563
	fenazina B4157
	azóis
	niclosamida
Desenvolvimento Clínico	derivados de rifamicina
	moxifloxacino
	sitafloxacino
	gemifloxacino
	T-3811ME
	rifametano
	rifalazil
	mikasome
	aconiazida
	SRL 172

Fonte: The current anti-TB drug research and development pipeline (www.who.int/tdr), 2003.

2.1.6. Epidemiologia

Em 1993, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1994) declarou a tuberculose como emergência global, considerando-se a gravidade do desenvolvimento mundial da doença.

Dados epidemiológicos da OMS (WHO, 2000b; WHO, 2001) indicam que alguns países, como Índia, Rússia, Filipinas e África do Sul, já tenham mais de 50% de sua população infectada. No contexto mundial, supõe-se que um terço da população já tenha tido contato com o bacilo. A cada ano, estima-se que 1% da população mundial é por ele infectada, sendo que 5 a 10% destes pacientes evoluirão para doença instalada ou para casos infecciosos (WHO, 2001; WHO, 2004a). Embora o número de pacientes que desenvolve a doença seja menor, o grau de preocupação com a incidência desta doença cresce a cada dia.

Na Rússia, por exemplo, o número de novos casos já ultrapassa 15.000/ano, sendo identificado entre eles alto índice de tuberculose resistente. Em Nova York, os casos triplicaram na última década com aumento significativo de casos resistentes (Smith, Moss, 1994).

O último relatório liberado pela OMS estima que, em 2000, ocorreram 8,7 milhões de novos casos, acima dos 8,4 milhões estimados em 1999. Este crescimento é devido, principalmente, a aumento na incidência da doença nos países africanos mais afetados pela epidemia de HIV/AIDS. Se a situação presente continuar, 10,2 milhões de novos casos serão esperados em 2005, sendo a África, o continente mais afetado (WHO 200; WHO, 2004a). O mesmo relatório mostra a seguinte distribuição mundial de pessoas afetadas pela doença: África: 35%, Américas: 18%, Leste do mediterrâneo: 29%, Europa: 15%, Sudeste da Ásia: 44% e Oeste do pacífico: 35%.

A figura 3 mostra a situação epidemiológica da tuberculose no mundo.

Figura 3. Epidemiologia da tuberculose (adaptado de WHO, 2001).

O Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) já em 1994 projetou aumentos na incidência global da tuberculose da ordem de 58% para o ano de 2005 e estimativas mostram que até 2020, aproximadamente 1 bilhão de pessoas serão infectadas pelo *M. tuberculosis*, 200 milhões desenvolverão a doença e 70 milhões morrerão desta, se nenhuma precaução for tomada (Rattan, Kalia, Ahmad, 1998).

No Brasil, mesmo com os esforços do Programa de Controle Nacional da Tuberculose, no ano de 1995, a descoberta de novos casos atingiu 75% do esperado e já são relatados em torno de 20.000 casos/ano sendo que destes, 1500 casos/ano são registrados só no Estado de São Paulo (Ximenes *et al.*, 1999).

O retorno dramático da tuberculose com percentuais alarmantes pode ser atribuído a fatores como aumento da migração para áreas da doença endêmica, crescimento e mudança na estrutura etária da população, empobrecimento populacional, má-nutrição e drogas de abuso (WHO, 1998b; Fätkenheuer *et al.*, 1999).

A estes fatores que agravam a situação da tuberculose somam-se a epidemia de HIV (talvez o mais importante deles) e as inadequadas interrupções do tratamento por parte do paciente, em função do recrudescimento dos sintomas levando à recidiva e ao surgimento de formas resistentes (Busillo *et al.*, 1992; Crofton, 1997). Ademais, a toxicidade dos

medicamentos, que necessitam ser administrados por longos períodos de tempo, contribui para esse efeito.

A tuberculose multi-resistente refere-se a casos para os quais o uso de isoniazida e de rifampicina não leva ao controle da doença.

Estudo conduzido pela OMS e pela União Internacional contra a Tuberculose e outras Doenças Pulmonárias (IUATLD) revelou que há disseminação global de tuberculose multi-resistente a fármacos (TB-MDR) em algumas áreas, como Índia, Rússia, Letônia, Estônia, República Dominicana, Argentina e Costa do Marfim – denominadas de “zonas vermelhas” (Srivastava, Cherian, 1987; Amin, 1990; Iseman, 1999b). Em 2000, o número de casos multi-resistentes chegou a 0,27 milhões (WHO, 2004a).

Indivíduos imunocomprometidos e que apresentam menor resistência ao *M. tuberculosis* desenvolvem a doença mais freqüentemente do que indivíduos normais. O risco de um paciente co-infectado com HIV/*M. tuberculosis* desenvolver a tuberculose ativa é de 5 a 10% ao ano, sendo muito maior que o risco ao qual está exposto um soronegativo, que é de 5 a 10% durante toda a vida. Estes pacientes apresentam maior taxa de doença pulmonar e maior probabilidade de transmitir a micobactéria para outros (Lima *et al.*, 1997).

A co-infecção por HIV modificou não apenas a tendência epidemiológica da tuberculose, mas também sua apresentação clínica, a duração do tratamento, a tolerância aos tuberculostáticos, a resistência aos fármacos disponíveis e, possivelmente, a suscetibilidade das pessoas diretamente envolvidas com o paciente (Boutotte, 1993.).

Número elevado de cepas de *M. tuberculosis* multi-resistentes tem emergido entre os pacientes co-infectados com AIDS e TB. Estas cepas multi-resistentes contribuem com a maior incidência de casos fatais: taxa de letalidade de 80% nos pacientes com AIDS e 50% em indivíduos não-imunodeprimidos, similar à taxa de letalidade de 50% do *M. tuberculosis* não-tratados nos indivíduos não-imunodeprimidos (Crofton, 1997). Apesar destas evidências, a busca sistemática por soropositivos entre os tuberculosos não é realizada, o que agrava ainda mais esta situação.

Segundo dados do Núcleo de Investigações em Vigilância da Tuberculose (NIVTb) para o período de 1993, dos 5.827 casos de tuberculose notificados em apenas 1.034 foi realizado o teste anti-HIV e, destes, 560 foram positivos (Lima *et al.*, 1997).

Desta forma, a real prevalência da associação HIV/*M. tuberculosis*, no Brasil e em vários outros países, está longe de ser estimada, o que dificulta a implantação de uma política de controle eficaz, principalmente no que diz respeito à proliferação de formas multi-resistentes.

Pode-se concluir, então, que o controle da tuberculose se constitui como grande desafio, por um lado, para as instituições de Saúde Pública no que se refere à detecção e

administração do tratamento eficaz aos pacientes e, por outro, para os pesquisadores que se dedicam ao desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento desta doença.

2.2. MALÁRIA

2.2.1 Etiologia e Transmissão (Ferreira, 1997)

A malária é uma protozoose causada por parasitas unicelulares pertencentes ao filo Apicomplexa e ao gênero *Plasmodium*, sendo as principais espécies *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*. Destas, apenas o *P. ovale* não é encontrado no Brasil (Preiser *et al.*, 2000).

As espécies mais disseminadas são o *P. vivax*, encontrado na Ásia, África, Oceania, Oriente Médio e nas Américas e responsável por infecções recorrentes e debilitantes, mas que raramente levam a óbito, e o *P. falciparum*, a mais agressiva das espécies, cuja infecção, freqüentemente leva ao óbito por coma ou anemia. Embora disseminado em todo o mundo, é mais comumente encontrado na África.

Os plasmódios são parasitos intracelulares obrigatórios de ciclo de vida complexo, que compreende hospedeiros vertebrados e invertebrados. Durante seu ciclo biológico apresentam-se sob diferentes formas ou estágios, as principais sendo: merozoítos, forma anelar, trofozoítos e esquizontes (formas do ciclo eritrocítico), gametócitos e esporozoítos (formas de transmissão). As formas eritrocíticas do parasito são mais amplamente estudadas.

Sua sobrevivência e transmissão dependem da capacidade invasiva de seus diferentes estágios ou fases de seu ciclo biológico (a saber: esporozoíto, merozoíto e oocineto) de reconhecer e invadir células hospedeiras apropriadas, hepatócitos e eritrócitos em mamíferos e células epiteliais do trato gastrointestinal do vetor.

Para tanto, possuem coleção de organelas próprias e características do filo na extremidade anterior de suas formas invasivas. Proteínas localizadas nestas organelas ligam-se a componentes das membranas das células hospedeiras, sendo responsáveis pelo reconhecimento e seleção de células-alvo (Sam-Yellowe, 1996; Preiser *et al.*, 2000).

Pouco se conhece sobre as proteínas encontradas em oocinetos e esporozoítos. Entretanto, as organelas apicais encontradas em todas as formas invasivas são, essencialmente, similares. A compreensão do processo invasivo de tais parasitas está completamente baseada em estudos de microscopia eletrônica realizados com merozoítos de *P. knowlesi* (Torii *et al.*, 1989; Bannister *et al.*, 1975).

No citoplasma do merozoíto (Figura 4) são encontrados:

- ✱ roptrias – par de dutos em forma de pêra, eletrodensos e ligados à membrana,

- × micronemas – pequenos corpos fusiformes ligados aos roptrias,
- × grânulos densos (cerca de 20) presentes em todas as partes do citoplasma.

Figura 4. Representação esquemática da ultra-estrutura do merozoíto.

O merozoíto é recoberto por fina capa de cerdas, cada qual sendo formada por conjunto de finos filamentos protéicos (2-3 nm) ancorados na membrana plasmática. Estes filamentos são utilizados pelo parasito para reconhecer e se ligar a proteínas da superfície da membrana de eritrócitos sendo, posteriormente, clivadas da superfície do merozoíto, quando este já se encontra no interior da célula hospedeira (Bannister *et al.*, 2000).

Estes filamentos são complexos protéicos constituídos de quatro polipeptídeos derivados da proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP-1), a proteína mais abundante na superfície desse estágio dos plasmódios, em associação com duas outras proteínas codificadas por genes distintos (Blackman, Holder, 1992; Chitnis, Blackman, 2000).

Após a invasão, o parasito sofre achatamento, resultando em uma forma fina e discóide, denominada forma anelar (Figura 5a). Na periferia de seu citoplasma encontram-se as principais organelas como o núcleo, mitocôndria e plastídio unidos, ribossomos, retículo endoplasmático, enquanto que o centro, bastante achatado, abriga poucas estruturas (Bannister *et al.*, 2000).

A distinção entre a forma anelar e o trofozoíto depende muito mais do tamanho da célula e de sua forma do que de diferenças internas. Assim, a forma anelar é também chamada de trofozoíto em forma de anel (Bannister *et al.*, 2000).

No trofozoíto (Figura 5b) o número de ribossomos livre multiplica-se e o retículo endoplasmático aumenta, denotando, assim, aumentada síntese protéica. A mitocôndria e o plastídio, ainda unidos, aumentam em comprimento de forma considerável. Entram em contato com série de outras organelas sugerindo, assim, interações metabólicas. A superfície do trofozoíto aumenta e torna-se irregular com depressões e invaginações (Slomianny, 1990).

Tecnicamente, um esquizonte é um parasita intraeritrocítico, que passa por divisões nucleares múltiplas e consecutivas (Figura 5c). Entretanto, a síntese de algumas moléculas é necessária para sua multiplicação, incluindo a síntese de DNA, que se inicia já durante a fase de trofozoíto (White, Kilbey, 1996; Arnot, Gull, 1998).

A divisão nuclear é acompanhada de diferentes alterações citoplasmáticas, que antecedem a formação do merozoíto incluindo a formação das organelas apicais (Bannister *et al.*, 2000).

O ciclo biológico da parasitose humana compreende como hospedeiros definitivos mosquitos do gênero *Anopheles*, sendo os mais importantes em termos de infectividade *A. darlingi*, *A. aquasalis*, *A. albitarsis*, *A. cruzi* e *A. bellator*. Neles desenvolve-se a fase sexuada, ou esporogonia. O homem é o hospedeiro intermediário, nele ocorrendo a fase assexuada do ciclo, que compreende a esquizogônia pré-eritrocítica tecidual e a esquizogonia eritrocítica (Figura 6)(Bannister *et al.*, 2000).

Ciclo Biológico do Agente Etiológico da Malária

Figura 6. Ciclo biológico dos plasmódios.
Adaptado de: <http://www.malaria.org/lifecycle.html>

A infecção no homem inicia-se pela picada da fêmea infectada do mosquito vetor, que injeta os esporozoítos na corrente sanguínea. Por meio de enzimas proteolíticas, invadem os hepatócitos e iniciam a esquizogonia tecidual. Os esquizontes dão origem aos merozoítos, que, por rompimento da célula infectada, caem na corrente sanguínea, infectando eritrócitos. Alguns dos esporozoítos que invadiram os hepatócitos evoluem para formas latentes, denominadas hipnozoítos, responsáveis pelas recaídas. Dois tipos de esporozoíto – taquiesporozoíto e bradiesporozoíto – seriam responsáveis, respectivamente, por períodos curtos e longos de latência.

Em seguida à fase pré-eritrocítica, os merozoítos invadem as hemácias e transformam-se em trofozoítos jovens. Esses vão a trofozoítos maduros e, por esquizogonia, transformam-se em esquizontes sanguíneos. Novamente, os merozoítos resultantes não liberados na corrente sanguínea ou invadem novas hemácias, ou se diferenciam em macro e microgametócitos, geralmente na proporção de um para quatro, permanecendo por 30 dias no sangue circulante. Estas formas são observadas de seis a oito dias após o primeiro acesso

febril. Também neste caso, o período entre as esquizogonias, varia de acordo com a espécie do parasito.

2.2.2. Mecanismos invasivos

O complexo ciclo biológico dos plasmódios inclui, como já descrito, três formas invasivas especializadas, que se distinguem entre si em suas arquiteturas celulares e em suas células-alvo. Entretanto, apesar de tais diferenças, sugere-se que o processo pelo qual tais formas invadem suas respectivas células hospedeiras seja similar, uma vez que as estruturas apicais requeridas para tanto são fundamentalmente iguais.

Pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na invasão dos hepatócitos, entretanto, a invasão pelos merozoítos é bastante conhecida (Chitnis, Blackman, 2000; Preiser *et al.*, 2000).

2.2.2.1 *Fase pré-eritrocítica* (Hommel, 1999)

Quando a fêmea do mosquito pica o indivíduo, esporozoítos são lançados em sua corrente sanguínea. Nesta, os esporozoítos invadem as células do parênquima hepático. Enquanto algumas evidências indicam que os esporozoítos são primeiramente captados pelas células de Kupffer e então transportados para os hepatócitos, outras sugerem que os esporozoítos rumam diretamente para os hepatócitos. A proteína circunsporozoítica (MSP-1), primeiro antígeno encontrado na superfície dos esporozoítos, liga-se a um domínio basolateral dos hepatócitos. Estima-se que, em menos de 60 minutos, a corrente sanguínea do paciente encontre-se livre de esporozoítos.

Nestas células, os esporozoítos passam por um processo de amplificação assexuada. Em uma ou duas semanas, um único esporozoíto é capaz de render cerca de 30.000 merozoítos. Durante este estágio pré-eritrocítico não há desenvolvimento de doença ativa.

A figura 7 esquematiza o processo de invasão, até onde é conhecido, dos hepatócitos.

Diagrama mostrando a ultra-estrutura hepática e o processo de invasão pelos esporozoítos

1. Esporozoíto na corrente sanguínea. Vasos sanguíneos recobertos pelas células de Kupffer, as quais separam os hepatócitos do sangue.
2. Esporozoíto é retirado da corrente sanguínea sendo interiorizado em um vacúolo dentro de uma célula de Kupffer.
3. O esporozoíto escapa da célula de Kupffer, talvez destruindo-a no processo, e invade o hepatócito vizinho.
4. Desenvolvimento do esporozoíto no interior do hepatócito.

Figura 7. Esquema do processo invasivo de hepatócitos por esporozoítos.
Adaptado de [http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects1999/malaria/ldpg.html]

2.2.2.2. Fase eritrocítica (Chitnis, Blackman, 2000)

A figura 8 esquematiza o processo de invasão dos eritrócitos pelos merozoítos.

Adaptado de:
Parasitology Today, vol. 16, no. 10, 2000

Figura 8. Invasão de eritrócitos pelos merozoítos.

O contato inicial do merozoíto com o eritrócito ocorre por meio das cerdas que recobrem sua superfície. Para que possa prosseguir com o processo invasivo, o merozoíto se reorienta de maneira que sua extremidade apical fique em íntima associação com o eritrócito e possa, assim, criar junções íntimas entre as duas membranas. Quando isto ocorre, o merozoíto entra num processo irreversível de invasão.

O contato apical estimula a secreção do conteúdo dos micronemas e das roptrias, resultando em invaginação da superfície do eritrócito. O parasito move-se para o interior da depressão formada e a junção íntima, anel de contato onde as duas membranas se encontram associadas, migra para o a extremidade posterior do parasito. Este se encontra agora envolto por um vacúolo parasitóforo e, durante a fase final de invasão, o conteúdo dos grânulos densos é liberado, promovendo expansão da membrana de revestimento do vacúolo.

No interior do eritrócito, a hemoglobina é a principal fonte de nutrientes do parasito. Esta é retirada do citossol próximo à membrana do vacúolo parasitóforo e englobada pelo vacúolo digestivo do parasito. Neste, a hemoglobina é submetida a proteases e condições ácidas suficientes para desnaturá-la (pH 4,0–4,5). As cadeias peptídicas são hidrolisadas para gerar aminoácidos, que serão aproveitados pelo parasito que é incapaz de sintetizá-los em quantidades suficientes (Rosenthal, Meshnick, 1996). O grupo heme é convertido em hemozoína e o ferro aproveitado para a síntese de proteínas dependentes deste como ribonucleotídeo redutase, superóxido dismutase (Becuwe *et al.*, 1996) e citocromos (Fry, Beesley, 1991).

Do metabolismo do grupo heme, é produzido um derivado colorido denominado hemozoína, comumente chamado de pigmento malárico (Tripathi, Garg, Tekwani, 2002).

Os eritrócitos sofrem complexas alterações que possibilitam ao parasito regular trocas de substâncias com o hospedeiro. O parasito também é capaz de controlar a expressão gênica do eritrócito para síntese de proteínas para sua utilização e como estratégia de defesa frente às possíveis respostas do organismo a sua invasão (Cooke, Wahlgren, Coppel, 2000).

Dependendo da espécie de plasmódio, os parasitas podem replicar para produzir 32 merozoítos invasivos. Entretanto, após a ruptura do eritrócito infectado somente os merozoítos que prontamente invadirem novos eritrócitos irão sobreviver. Como estratégia de sobrevivência, alguns dos merozoítos liberados evoluem a gametócitos, formas de transmissão do parasito (Ferreira, 1997).

2.2.3. Patologia (Clark, Schofield, 2000)

O principal sintoma relacionado à patofisiologia do parasito é a febre intensa, ocorrendo em intervalos de 24 a 72 horas, geralmente acompanhada por náusea, dores de cabeça e dor muscular, entre outros sintomas. A febre característica está correlacionada a aumento no nível de TNF α circulante associado à liberação de proteínas do parasito no sangue durante a ruptura dos eritrócitos.

Como mencionado anteriormente, o parasito controla a expressão gênica do hospedeiro para sintetizar proteínas importantes para a sua patofisiologia. Algumas destas

proteínas agregam-se na superfície do eritrócito, em formações denominadas “knobs”, e que mediam processos de citoaderência e de formação de rosetas (Krishna, 1997). A citoaderência é a propriedade das células infectadas de se aderirem ao endotélio capilar prevenindo, desta maneira, a depuração do parasito do organismo através do sistema reticuloendotelial.

Já a formação de rosetas é a aderência das células infectadas a outros eritrócitos não-infectados formando agregados que podem bloquear a microcirculação. A obstrução da microcirculação pode resultar em danos para o fornecimento de oxigênio e outros precursores metabólicos para órgãos vitais, além de poder causar, por vezes, pequenos focos hemorrágicos.

Quando não tratada adequadamente, a malária pode evoluir para quadros mais graves como falências renal e hepática, além de disfunções neurológicas.

2.2.4. Tratamento (Ferreira, 1997)

Depois de diagnosticada a parasitose, o tratamento deve ser iniciado o mais cedo possível. Assim como a tuberculose, a malária requer tratamentos com associações de fármacos, regimes terapêuticos, a fim de se evitar o desenvolvimento de resistência pelo parasito, uma vez que é mais difícil, para este, encontrar formas de superar todas as inibições provocadas pelos diferentes fármacos. Além disto, a eficácia do tratamento pode ser aumentada, especialmente quando os componentes da associação atuam por mecanismos diferentes e/ou complementares. À vista deste sinergismo, é possível diminuir as doses necessárias para se obter igual ou maior efeito, com repercussões importantes no tocante à toxicidade.

Regimes específicos de tratamento dependem da gravidade do caso, da parasitemia diagnosticada e da espécie responsável pela infecção. Também depende destes fatores a escolha da via de administração dos fármacos que fazem parte do esquema terapêutico (Chin, 2000).

Durante o tratamento os pacientes devem ser monitorados quanto à resposta terapêutica e possíveis complicações. Acompanhamento continuado é importante em casos de malária grave, em que a rápida detecção de complicações e a intervenção imediata são determinantes para a sobrevivência do paciente (Chin, 2000).

Considerando-se o ciclo etiológico da malária, os quimioterápicos antimaláricos podem atuar, no homem, nas fases pré-eritrocítica e eritrocítica. São, então, classificados como esquizontídeos teciduais e sanguíneos, respectivamente. Alguns deles podem atuar nos gametócitos, o que implica aspecto profilático, considerando-se a infecção do mosquito.

Fármacos que atuam na fase pré-eritrocítica representam a profilaxia causal, ou seja, inviabilizam o estágio eritrocítico. Também podem evitar recaídas, caso se trate de *P. vivax* ou *P. ovale*. Associados a esquizonticida sanguíneo durante o ataque agudo podem conduzir à cura radical.

Fármacos com ação na fase eritrocítica podem ser responsáveis pela cura clínica, correspondendo à interrupção dos sintomas clínicos. A cura supressiva, que também acarretam, representa a eliminação total da parasitemia e é resultado do tratamento continuado com tais fármacos. Há esquizonticidas de ação rápida e de ação lenta.

O primeiro antimalárico utilizado foi a quinina, esquizonticida sanguíneo alcaloídico de ação lenta e gametocítica para *P. vivax* e *P. malariae*. Extraída da casca de espécies de *Cinchona*, deixou de ter interesse terapêutico a partir da introdução de fármacos sintéticos, o primeiro deles a pamaquina, em 1923.

A cloroquina é o fármaco de escolha para o tratamento de pacientes infectados com *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e também em casos de cepas sensíveis de *P. falciparum*. É esquizonticida sanguíneo de ação lenta, acumulando as atividades gametocítica e esporonticida. Provoca série de efeitos colaterais, no entanto, o principal problema dessa 4-aminoquinolina é a resistência que suscita em malária provocada por *P. falciparum*.

Análogo da cloroquina, a amodiaquina é de ação rápida contra esquizontes sanguíneos das quatro espécies de plasmódios e em algumas cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina. Contudo, a OMS desaconselha seu uso profilático e alerta para o emprego apenas em crises agudas da malária devido à alta hepatotoxicidade e à agranulocitose provocada por este fármaco.

A primaquina é o único esquizonticida tecidual disponível, com efeito gametocítico em *P. vivax* e *P. ovale*, em seguida ao tratamento com cloroquina. Seu uso é limitado ao terapêutico em razão dos efeitos adversos graves que provoca, como a anemia hemolítica.

A mefloquina é esquizonticida sanguíneo de ação rápida, pertencente à classe dos quinolinometanóis, sendo, assim, análogo da quinina. É principalmente utilizada no tratamento e profilaxia de infecções causadas por *P. falciparum* resistente à cloroquina ou multi-resistente. Promove cura supressiva contra *P. falciparum* e, embora tenham sido observadas recaídas, resulta, também, na supressão de *P. vivax*. O fato de ser possível a resistência cruzada com a cloroquina leva à recomendação da OMS acerca do uso criterioso do fármaco, a fim de evitar a disseminação de resistência ao mesmo. Pela mesma razão, a mefloquina não é usualmente utilizada em monoterapia. Foi empregada em associação à sulfadoxina e pirimetamina, comercialmente conhecida como Fansimef (Peters, 1995), mas sem eficácia comprovada em razão, especialmente, da diferença de meias-vidas entre os fármacos.

A halofantrina, introduzida em 1984, é derivado fenantrenometanólico de ação esquizonticida rápida (Bryson, Goa, 1992). É eficaz no tratamento e profilaxia de infecções por *P. falciparum* resistente à cloroquina ou multi-resistente. Apresenta problemas de biodisponibilidade levando, assim, a diferentes respostas terapêuticas para diferentes pacientes, falhas no tratamento e resistência cruzada à mefloquina. Observam-se, ademais, altas taxas de recrudescência e problemas com relação à segurança no seu emprego.

Outro esquizonticida de ação rápida é a artemisinina (Hien, White, 1993), Extraída da *Artemisia annua*, era utilizada pelos chineses no tratamento de febre desde ano 341 da era cristã. É uma lactona sesquiterpênica de ação antimalárica em *P. falciparum* e *P. vivax*.

Outros fármacos utilizados na terapêutica da malária são:

- ✕ Pirimetamina - fármaco esquizonticida sanguíneo de ação lenta, geralmente utilizado em associação com sulfonamidas como a sulfadoxina;
- ✕ Biguanidinas e metabólitos triazínicos, como o proguanil e cicloguanil – esquizonticidas sanguíneos de ação lenta;
- ✕ Sulfonamidas – sulfadiazina, sulfadoxina, sulfisoxazol, entre outros;
- ✕ Antibióticos – como a tetraciclina e a doxiciclina.

2.2.5. Epidemiologia

A malária é uma das três principais causas de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento, matando mais pessoas que qualquer outra doença comunicável com exceção da tuberculose (WHO Fact Sheet, 1998).

Aproximadamente 40% da população mundial vivem sob o risco de contrair a parasitose, que se distribui em 100 países ou territórios (Figura 9). Quase 300 milhões de novos casos são registrados e 1,09 milhões de pessoas morrem de malária a cada ano em todo o mundo. Aproximadamente 90% destas mortes ocorrem em regiões sub-saarianas, na África, onde a maior parte dos casos envolve crianças menores de 5 anos de idade (WHO, 1992b; Nchinda, 1998, WHO, 2004b). A figura 9 mostra a distribuição mundial da malária.

Figura 9. Mapa de distribuição da malária.

Adaptado de [http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects1999/malaria/ldpg.html]

Os países endêmicos para a malária são alguns dos mais pobres do mundo. Comunidades rurais são particularmente afetadas, enquanto a infecção de sociedades urbanas está relacionada ao crescimento desordenado em torno das mesmas, particularmente na África e no sudeste da Ásia (WHO Fact Sheet, 1998).

Na África, a malária mata uma criança a cada 30 segundos. Em números absolutos, a malária mata 3000 crianças menores de 5 anos por dia, taxa que ultrapassa a mortalidade infantil devido à AIDS. Além disto, contribui, indiretamente, ao agravamento de quadros clínicos de infecções respiratórias, diarreia e má-nutrição (WHO Fact Sheet, 1998).

Crianças que sobrevivem à infecção têm seu desenvolvimento físico e intelectual afetados, uma vez que o parasito drena, em pouco tempo, nutrientes necessários aos processos fisiológicos de crescimento e desenvolvimento infantil.

Aquecimento global e outros eventos climáticos, tais como o “El Niño”, podem favorecer a disseminação da doença. Outros fatores que também contribuem são os conflitos militares e civis e a migração humana para regiões endêmicas (Nchinda, 1998).

A cloroquina, o mais acessível dos antimaláricos, está perdendo sua eficácia rapidamente em quase todos os países endêmicos. Em alguns locais do sudeste asiático, cepas de plasmódios têm desenvolvido resistência a quatro diferentes tipos de fármacos antimaláricos (Cowman, Foote, 1990).

Este rápido desenvolvimento de resistência representa grave problema frente às alternativas terapêuticas atuais. Fármacos que ofereçam segurança, eficácia e acessibilidade econômica estão rapidamente se esgotando e a descoberta de novos antimaláricos faz-se urgente (Souza, 1992).

2.3. LEISHMANIOSE

2.3.1. Etiologia e Transmissão

Os parasitas do gênero *Leishmania* são protozoários flagelados da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (Magill, 1995). Esta ordem caracteriza-se por apresentar mitocôndria única (denominada cinetoplasto) rica em DNA mitocondrial denominado kDNA (Simpson, 1987; Wirth, Pratt, 1990). As características morfológicas dos gêneros que compõem esta família são bem homogêneas e todas as espécies envolvem parasitas. Os tripanossomatídeos apresentam uma rede de microtúbulos subpeliculares bastante rígida, conferindo a estes protozoários formas celulares bem definidas durante seu ciclo evolutivo (Chang *et al.*, 1985).

São parasitos digenéticos e, assim, apresentam em seu ciclo de vida apenas duas formas evolutivas: a forma promastigota, que é flagelada e extracelular, e a forma amastigota, que é intracelular e sem movimentos. Os promastigotas, de vida extracelular no trato alimentar do inseto vetor, apresentam corpo alongado, medindo entre 14 e 20 μm , e flagelo livre. Os amastigotas têm corpo ovóide, medindo entre 2,1 e 3,2 μm , e flagelo interno (McKean *et al.*, 1999). Esta é a forma em que o parasito reside no interior dos macrófagos do hospedeiro vertebrado (Figura 10).

Figura 10. Morfologia da *Leishmania*.

Fonte: [<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>]

A leishmaniose é transmitida através da picada de insetos de cerca de 3 mm, genericamente conhecidos como flebotomídeos (Killick-Kendrick, 1990) (filo: *Diptera*, ordem: *Psycodidae*, família: *Phlebotomidae*). Dois gêneros de flebotomídeos estão diretamente envolvidos na transmissão da doença. Na Europa, Ásia e África tem-se, principalmente, o gênero *Phlebotomus* (Lainson, Shaw, 1978), de cujas 500 espécies cerca de 30 foram identificadas como vetores da doença, e, nas Américas, o gênero *Lutzomyia* (Young, Arias, 1992). Estes insetos podem ser encontrados em quase todas as regiões de climas semitropical e temperado. A fêmea, hematófaga em função da necessidade de proteínas para

a oviposição, deposita seus ovos em fezes, lixo, ruínas urbanas, troncos de árvores ou em qualquer lugar onde as larvas possam conseguir matéria orgânica, calor e umidade para se desenvolver. Embora vários estudos já tenham sido realizados com o objetivo de eliminar o inseto vetor como forma de controle da leishmaniose (Oliveira Filho, Melo, 1994), esse objetivo ainda parece distante de ser alcançado.

O ciclo biológico do parasito envolve vertebrados e invertebrados como hospedeiros (intermediários ou definitivos). Os hospedeiros vertebrados incluem mamíferos silvestres (reservatórios naturais) como o homem, cães e alguns roedores.

Figura 11. Ciclo biológico da *Leishmania* spp.

Adaptado de [http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/lifecycles/leishmania_lifecycle.html]

O parasito se desenvolve no interior do flebotomídeo durante período de 4 a 25 dias. Quando a fêmea pica o indivíduo, inocula sua saliva contendo as formas promastigotas iniciando, assim, a etapa de diferenciação em outro hospedeiro.

Estimulando o sistema imunológico do hospedeiro contra si próprio e sendo englobado pelo macrófago (Figura 11), o parasito dá início ao processo de diferenciação da forma promastigota infectante para a amastigota, durante o qual há aumento na expressão de certos

genes, que condicionam o parasito à sobrevivência no interior hostil dos fagolisossomos (Chang, Chauduri, Fong, 1990).

Sua multiplicação se dá por fissão binária tanto no hospedeiro vertebrado como no vetor invertebrado, como se observa na Figura 12. Embora se acredite que o gênero *Leishmania* dependa de mutações para sua variabilidade, há evidências recentes da formação de híbridos, ampliação e depleção de locus gênicos e possível troca genética entre organismos distintos, sugerindo que a recombinação genética pode estar envolvida na evolução desta parasitose (Pages, Bastien, Veas, 1989).

Figura 12. Processo de infecção por *Leishmania* spp.

Fonte: Jeffrey, 1991

No Novo Mundo diversas ordens de mamíferos silvestres (reservatórios naturais) e várias espécies de flebotomídeos estão envolvidas na transmissão da leishmaniose. A maioria dos casos de infecção humana está relacionada a hábitos, atividades primárias ou secundárias de indivíduos que exploram ou habitam florestas. Recentemente, registra-se aumento significativo nos casos de leishmanioses em áreas peri-urbanas de grandes cidades, particularmente no Brasil (Fiocruz, 1997).

2.3.2. Sobrevivência no lisossomo (Bogdan, Rollinghoff, 1998)

Parasitar células hospedeiras como macrófagos engloba série de vantagens anteriormente discutidas para as micobactérias causadoras da tuberculose no item 1.3. deste trabalho.

Entretanto, células do sistema imune, em especial os macrófagos, possuem diferentes mecanismos de defesa contra corpos estranhos ao organismo. Estes mecanismos englobam:

- ✕ Estresse oxidativo → a fagocitose ativa uma NAD(P)H oxidase na membrana plasmática do macrófago. Esta enzima transfere prótons ao oxigênio molecular, formando radicais hidroxilas e superóxido altamente reativos no local da formação do fagossoma. Estes radicais reagem com a membrana fosfolipídica do patógeno e com suas macromoléculas;
- ✕ Acidificação → após fusão do fagossoma com lisossomos, as vesículas são acidificadas por uma próton ATPase. A redução do pH causa desnaturação de proteínas dos microrganismos, que se tornam suscetíveis a hidrolases ácidas;
- ✕ Digestão → Ação das hidrolases ácidas sobre o DNA, RNA, proteínas e carboidratos.

De forma análoga às micobactérias, a *Leishmania* deve possuir estratégias que possibilitem sua sobrevivência em ambiente hostil.

Os principais mecanismos de defesa envolvem moléculas de superfície da *Leishmania*, conhecidas como fatores de virulência. As moléculas mais estudadas até o momento são: glicosilfosfatidilinositol (GPI), glicosilfosfolipídeo (GIPL), lipofosfoglicana (LPG), fosfoglicanas (PG), proteofosfoglicanas (PPG), leishmanolisina (gp63) e cisteína-proteases (CPs) (Chang, Chaudhuri, Fong, 1990; Chang, Nacy, 1986).

Estes fatores são determinantes para os eventos seqüenciais responsáveis pela sobrevivência do parasita no interior do organismo hospedeiro, a saber: (A) evasão dos fatores líticos humorais, (B) ligação do parasita ao macrófago e posterior invasão do fagócito, (C) sobrevivência ao estresse oxidativo, (D) diferenciação de promastigotas em amastigotas e (E) replicação das amastigotas (Chang, McGwire, 2002).

A gp63, por exemplo, é uma ectometaloprotease especialmente abundante na superfície de promastigotas, que proporciona ao microrganismo resistência à citólise mediada pelo complemento. Esta mesma molécula, atuando em conjunto com as lipofosfoglicanas (LPGs), também auxilia no processo invasivo que ocorre via endocitose mediada por receptor (McGwire *et al.*, 2002; Brittingham *et al.*, 1995).

Uma vez no interior do parasita, a enzima superóxido dismutase é a primeira resposta do parasita ao estresse oxidativo. Esta enzima combina radicais superóxido para formar oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. Este último, tóxico, é, então, degradado pela catalase ou peroxidases a oxigênio e água.

Entretanto, o valor da superóxido dismutase como defesa contra o estresse oxidativo é questionável (Flohé, Hecht, Steinert, 1999), uma vez que estes parasitos não possuem sistemas típicos de destoxificação de H_2O_2 próprios, utilizando-se, para tanto, dos sistemas das células hospedeiras. A super expressão desta enzima levaria a espécies de parasitos mais suscetíveis a fármacos que atuem sobre o metabolismo redox, presumivelmente porque os parasitos não conseguiriam destoxificar, de maneira eficaz, o superóxido gerado.

A redução da glutathiona é outra importante estratégia contra o estresse oxidativo. Os parasitos transformam grande parte de sua glutathiona em derivado *bis*-glutathionil espermidínico denominado tripanotiona (Fairlamb, Cerami, 1985). Em pH fisiológico, os grupamentos SH deste composto são mais reativos que a glutathiona devido aos baixos valores de pK (Moutiez, 1994). A tripanotiona, então, parece ser a responsável pela redução de hidroperóxidos pela formação do dissulfeto cíclico oxidado correspondente (Figura 13).

Figura 13. Sistema tripanotiona-tripantionona redutase.
Adaptado de : <http://www.icp.ucl.ac.be/opperd/parasites/drug-act.htm>

Desde sua descoberta, este sistema de metabolismo redox único tem atraído muito interesse, uma vez que a defesa dos parasitos da família Trypanosomatidae contra o estresse oxidativo está quase completamente baseada na tripanotiona. O entendimento deste

mecanismo pode levar à descoberta de novos alvos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos contra estes parasitos.

As etapas seguintes à resistência ao estresse oxidativo -- diferenciação de promastigotas em amastigotas e o processo de replicação de amastigotas -- podem envolver a participação dos fatores de virulência já citados, mas os mecanismos pelos quais estes fatores atuam nestes processos ainda não são conhecidos.

Embora os fatores de virulência sejam, em sua maioria, glicoproteínas da superfície do parasito, não há evidências de sua responsabilidade pelos sintomas observados nas leishmanioses resultantes da resposta do sistema imunológico do hospedeiro. Repetidas injeções de gp63 ou LPG em animais suscetíveis não reproduziram os sintomas típicos da doença como lesões cutâneas ou hepatoesplenomegalia (Chang, McGwire, 2002).

É importante ressaltar que pacientes com leishmaniose produzem anticorpos contra estes fatores, como anti-LPG e anti-gp63, mas as titulações medidas são insignificantes (Chang, McGwire, 2002).

Os fatores patoantigênicos, ou seja, responsáveis pelos sintomas clínicos, englobam complexos protéicos como tubulinas, chaperonas, ribossomas, glicossomas, entre outros (Requena, Alonso, Soto, 2000). Todos estes fatores são proteínas estruturais conservadas ou proteínas solúveis do citoplasma as quais, freqüentemente, se encontram complexadas a outras moléculas para formar estruturas subcelulares.

Acredita-se que durante o desenvolvimento da infecção, alguns amastigotas são lisados, inadvertidamente, devido à ineficácia dos mecanismos protetores do parasito. Desta maneira, as moléculas citoplasmáticas dos amastigotas são expostas ao sistema imune do hospedeiro resultando, assim, no quadro imunopatológico observado na doença. Estes epitopos, embora produzam altas titulações de anticorpos, não contribuem para imunidade total antileishmania (Chang, McGwire, 2002).

2.3.3. Patogenia

Dentro de três categorias amplas, leishmaniose visceral (LV), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea (LC), as infecções comportam-se similarmente, mas com relação às manifestações clínicas e patológicas podem-se observar características típicas e específicas do parasita, tais como, local de infecção, gravidade, capacidade de cura ou invasão metastática, com ou sem acometimento da mucosa (WHO, 1998c; Glew *et al.*, 1988).

Os sintomas incluem lesões, que se desenvolvem na pele exposta das orelhas, narinas, lábios e cauda (Schlein, *et al.* 1984). Ocasionalmente, as lesões se desenvolvem no

pescoço ou outras partes do corpo e resultam em perda de pelos. Os parasitos também podem causar problemas em órgãos internos como pulmões, baço, fígado e rins. Os sinais clínicos da leishmaniose em cachorros podem ser confundidos facilmente com outras doenças como *lupus*, neoplasias e disfunções endócrinas (Harith, Slapendel, Reiter, 1989). Alguns animais, porém, não mostram qualquer sinal óbvio da doença (Jambou, Marty, Jambou, 1986).

2.3.3.1. *Leishmaniose visceral* (Rey, 1991)

A leishmaniose visceral, normalmente causada pela *L. donovani*, pode ser assintomática e sua magnitude atinge proporções desconhecidas. Também conhecida como *kala azar* é a mais grave forma da doença e, se não tratada, leva a taxas de mortalidade de 100%.

Essa forma clínica causa importantes alterações celulares e teciduais, com acentuada debilitação. É, freqüentemente, crônica e insidiosa, caracterizada por significativo aumento do baço (esplenomegalia) e fígado (hepatomegalia), febres de longa duração, perda de peso, diarreia, distensão abdominal, anemia, palidez, taquicardia e tosse. Espleno e hepatomegalias estão relacionadas com a duração da doença e, raramente, observa-se hipertensão portal (Figura 14). Essa última condição é devida à fibrose leishmaniótica, condição conhecida por cirrose de Rogers. A hepatomegalia é resultante das células de Kupffer cheias de amastigotas. A medula óssea é infiltrada por macrófagos parasitados, característica essa de grande importância diagnóstica, e esse processo invasivo pode ser danoso para a produção das células vermelhas e leucócitos, levando à leucopenia. A parasitemia induz ativação de células B, causando significativa elevação nos níveis de proteínas e IgG plasmáticos.

Figura 14. Crianças apresentando distensão abdominal característica de hepatesplenomegalia por leishmaniose visceral.

Fonte: TDR Image Library

Do ponto de vista clínico, a confirmação da doença é essencial, já que os sintomas descritos podem ser relacionados com várias patologias. Deve-se suspeitar de leishmaniose

visceral na presença dos seguintes sintomas: enfraquecimento com hepato e esplenomegalia, febre intermitente de 38 °C a 40 °C, sangramento nasal, palidez, perda de peso, tosse, diarreia, alopecia e dores abdominais. A confirmação vem dos testes diagnósticos específicos.

Recaídas da doença após tratamento aparentemente bem-sucedido parecem ocorrer entre 2 a 6 meses pós-tratamento, o que indica a necessidade de um período de 6 meses de acompanhamento depois de declarada a cura clínica e parasitológica, sendo a contagem de plaquetas um bom indicador prognóstico da resposta do paciente à terapia (Nyakundi, 1994).

2.3.3.2. *Leishmaniose mucocutânea*

A leishmaniose mucocutânea normalmente ocorre após leishmaniose cutânea causada por *L. brasiliensis* em cerca de 3% a 10% dos casos, sendo mais comum no Brasil, Bolívia e Peru, onde é chamada “espundia” (Dedet, 1999).

Caracteriza-se por apresentar uma imunidade celular exacerbada e lesões altamente destrutivas causando deformações desfigurantes da região oral e nasofaríngea, que aparecem tardiamente após a cicatrização das lesões primárias (Dedet, 1999).

A doença pode permanecer localizada ou, gradualmente, estender-se para a nasofaringe, palato, úvula, laringe e vias aéreas superiores (Figura 15). Apresenta granuloma, constituído de linfócitos e macrófagos, com poucos parasitos (de Magalhães *et al.*, 1986).

Figura 15. Lesões causadas por *L. brasiliensis*.

Adaptado de: <http://www.hhmi.ucla.edu/C168/week4/lecture1.html>

A resposta ao tratamento, à base de antimoniais ou anfotericina B, é lenta e, no caso de edema das vias aéreas afetadas durante a administração dos fármacos, torna-se necessária a administração concomitante de corticóides.

2.3.3.3. Leishmaniose cutânea

A leishmaniose cutânea, a despeito das lesões inestéticas, apresenta freqüentemente cura espontânea. De acordo com alguns autores, as lesões geralmente regredem entre 6 e 12 meses após o início da doença (Grevelink, 1996). Outros autores, no entanto, descobriram que a regressão da úlcera está relacionada à espécie causadora (Dowlati, 1998), conforme apresentado na Tabela VII.

Tabela VII. Tempo médio de cicatrização das úlceras na leishmaniose cutânea.

<i>Espécie de Leishmania causadora</i>	<i>Tempo de cura espontânea</i>
<i>L. major</i>	2 a 6 meses
<i>L. mexicana</i>	cerca de 8 meses
<i>L. tropica</i> e <i>L. brasiliensis</i>	8 a 12 meses
<i>L. aethiopica</i>	3 a 5 anos
<i>não especificada</i>	ausência de cura (leishmaniose cutânea crônica)

A *L. infantum* tem sido recentemente identificada como possível agente causador de leishmaniose cutânea.

Esta forma da doença produz lesões ulcerosas em partes expostas do corpo tais como face, braços e pernas. Pode produzir grande número de lesões causando graves danos estéticos, que podem comprometer o convívio social do paciente.

As lesões típicas são úlceras crônicas de 2 a 5 cm de diâmetro (Figura 16), com bordas endurecidas, que podem estar cobertas por uma crosta endurecida ou apresentar exsudato, tornando-se dolorosa se muito grande ou infectada com agentes secundários, como bactérias ou leveduras.

Figura 16. Lesões causadas por *L. infantum*.

Fonte: [http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/leishmaniose_cut_nea.htm]

As lesões ulceradas mostram grau variável de hiperplasia de células epidérmicas, que dependem do tempo de evolução e do tipo de lesão produzida (Convit *et al.*, 1993). O desenvolvimento das lesões depende do estado imunitário do paciente e de fatores como o estado de imunodeficiência adquirida por subnutrição ou da associação com a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Albrecht, 1998).

Outras formas menos comuns de leishmaniose também podem ser encontradas como a leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) e a leishmaniose viscerotrópica.

A co-infecção entre *Leishmania* e o HIV (Albrecht, 1998) é um fator que contribui para o novo perfil da parasitose nos últimos anos. Sua incidência tem aumentado a cada ano, distribuindo-se amplamente (Laguna, Andrados, Alvar, 1997).

Aparentemente, existe relação sinérgica entre os dois organismos patogênicos. Promastigotas são capazes de disparar a produção de $\text{TNF}\alpha$ e esta citocina estimula a replicação do vírus da imunodeficiência humana. Dos pacientes com leishmaniose visceral, 89% têm níveis aumentados de $\text{TNF}\alpha$ circulante. Indivíduos HIV-positivos são aparentemente mais suscetíveis à leishmaniose visceral ou são capazes de desenvolver essa doença mesmo após infecção com espécies dermatóricas de *Leishmania*, sugerindo que o tropismo do parasita é altamente influenciado pelo estado imunológico do hospedeiro (Albrecht, 1998).

2.3.4. Tratamento

O controle da leishmaniose pode ser efetuado sob dois aspectos: a eliminação do vetor, ou seja, do inseto transmissor, ou a cura da parasitemia no hospedeiro. A primeira abordagem, embora seja bastante utilizada (Lacerda, 1994), não se tem revelado eficiente, pois é praticamente impossível erradicar um inseto que se espalha por uma área geográfica tão ampla. Já o tratamento do hospedeiro, é realizado basicamente pelo tratamento quimioterápico (Carvalho *et al.*, 2000).

Uma terceira possibilidade seria a eliminação dos hospedeiros intermediários, o que é impraticável, já que, especialmente nas áreas de floresta, a maior parte deles não foi, ainda, identificada. Mesmo que isso fosse possível, sua eliminação geraria grave desequilíbrio ecológico.

Os antimoniais pentavalentes são derivados do ácido estilbônico, sendo que cerca de 15% do antimônio, encontra-se no estado de oxidação trivalente (Franco, 1995). Os mais empregados são: antimoniato de meglumina (Glucantime® – Laboratórios Rhodia) e estibogluconato sódico (Pentostan® – Laboratórios Borroughs-Wellcome).

Seu mecanismo de ação permanece não esclarecido, mas aparentemente envolve a inibição da síntese de ATP (Berman, 1989), possivelmente por interação covalente com

grupos sulfidríla de enzimas essenciais do parasito. Primeiramente, os antimoniais pentavalentes devem ser convertidos por redução *in vivo* em suas formas trivalentes ativas correspondentes (Korolkovas, 1988).

Os efeitos adversos observados incluem náusea, vômitos, diarreia, alterações no eletrocardiograma (ECG) e convulsões. Entretanto, alguns dos efeitos colaterais relatados no tratamento da leishmaniose visceral são idênticos aos próprios sintomas da doença, não podendo, assim, ser claramente atribuídos ao tratamento (Korolkovas, 2004).

Se o tratamento com antimoniais pentavalentes falha, podem ser empregados, como fármacos de segunda escolha, a pentamidina e a anfotericina B, que além de muito tóxicas, são de difícil administração (Berman, 1988).

A pentamidina é uma diamina aromática bastante eficaz no tratamento de leishmaniose visceral. Seu mecanismo de ação, embora ainda não claramente estabelecido, provavelmente envolve a interação com nucleotídeos, resultando em danos à replicação do DNA, síntese de RNA, fosfolípidos e biossíntese de proteínas. Além disso, interferência com a captação ou função de poliaminas poderia também ser responsável por sua atividade.

A anfotericina B é um antibiótico macrolídico e poliênico, que age nos esteróis e fosfolípidos da membrana celular de *Leishmania sp.* provocando a perda da permeabilidade seletiva daquela organela. É muito ativa *in vitro*, matando formas extra e intracelulares na concentração de 1 µg/mL de meio de cultura. Em *hamsters* e macacos infectados com *L. donovani*, a anfotericina B foi cerca de 400 vezes mais potente que o estibogluconato sódico (Olliaro, Bryceson, 1993).

Sua toxicidade não é completamente compreendida. Alguns resultados sugerem que deva resultar de um aumento da resistência vascular, com diminuição da filtração glomerular e do fluxo sanguíneo (Tolins, Raji, 1988).

Porém, sabe-se que, embora a anfotericina B se ligue, preferencialmente, aos esteróis substituídos na posição 24, como o ergosterol, principal esterol da *Leishmania*, até certo ponto ocorre ligação também com o colesterol da membrana celular humana, o que poderia também explicar sua toxicidade (Singh, Sivakumar, 2004).

Outros fármacos que têm demonstrado eficácia no combate à leishmaniose (Carvalho *et al.*, 1999) são nistatina, estilbamidina, mepacrina, aminosidina, cetoconazol, hidroxiestilbamidina, alopurinol, alopurinol-ribonucleosídeo e o composto WR-6026, todos com nível de toxicidade relativamente alto, um dos fatores que tem impulsionado a busca de novos leishmanicidas (Rezai *et al.*, 1988).

Semelhante ao que ocorre na tuberculose, o tratamento é relativamente longo, podendo requerer até um ano de administração do fármaco. Isto implica em baixa adesão do paciente ao tratamento, que, por ser prolongado, torna-se dispendioso, além de acentuar a

ocorrência dos efeitos colaterais indesejáveis, como artralgia, mialgia, nefro e hepatotoxicidade (Pécoul, 1999).

2.3.5. Epidemiologia

Atualmente, as leishmanioses afetam cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países, 72 destes em desenvolvimento. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção por diferentes espécies de parasitos causadores da doença (WHO, 1998c) sendo que o número atual de casos fatais é de 57 mil por ano (WHO, 2004c).

A incidência anual de novos casos é de cerca de 2 milhões: 1,5 milhão de leishmaniose cutânea e 0,5 milhão de leishmaniose visceral (WHO, 2004c).

A distribuição total é, aproximadamente, a seguinte (WHO, 2001b):

- ✕ 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão;
- ✕ 90% dos casos de leishmaniose muco-cutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru;
- ✕ 90% dos casos de leishmaniose cutânea distribuem-se entre Afeganistão, Arábia Saudita, Brasil, Irã, Peru e Síria.

A Figura 17 mostra a distribuição mundial das leishmanioses.

Figura 17. Distribuição mundial das leishmanioses.
Fonte: www.wehi.edu.au/.../handman/leishmaniasis.html

Como as demais endemias tropicais, as leishmanioses estão relacionadas ao desenvolvimento econômico e às interferências do homem na natureza, o que acarreta maior exposição ao vetor.

Desde 1993, regiões endêmicas têm se expandido significativamente, com aumento do número de casos notificados. Aspecto importante a ser considerado nessa parasitose é que novos surtos têm sido registrados em regiões não-endêmicas (Arias, Monteiro, Zicker, 1996), como cidades e regiões industrializadas, provavelmente como consequência dos movimentos migratórios do campo para a cidade.

Também há que se considerar a contribuição de doenças imunossupressoras como a AIDS para o aumento do número de pessoas infectadas desenvolvendo a doença visceral.

A co-infecção *Leishmania*/HIV é considerada doença emergencial especialmente no sudeste europeu, onde 25 a 70% dos casos de adultos com leishmaniose visceral estão correlacionados com infecção pelo HIV e 1,5 a 9,5% dos casos de AIDS acabam por desenvolver leishmanioses ou recém-adquiridas ou reativadas. Epidemias de leishmaniose visceral também ocorrem no sudeste e leste do Sudão e países adjacentes com Etiópia (Figura 18) (Laguna, Adrados, Alvar, 1997).

Figura 18. Distribuição geográfica de casos de co-infecção HIV/*Leishmania*.

Adaptado de: [<http://www.who.int/emc/diseases/leish/leisgeo1.html>]

A maioria dos casos de co-infecção é relatada no Brasil, onde a incidência da AIDS é responsável pelo aumento de 0,8 casos/100.000 habitantes, em 1986, para 10,5 casos/100.000 habitantes, em 1997. Assim, também no Brasil tem-se notificado o ressurgimento da leishmaniose visceral (Arias, Monteiro, Zicker, 1996).

O desenvolvimento de resistência do parasito aos derivados antimoniais tem sido relatado em diversas partes do globo, especialmente em regiões onde há alta prevalência desta doença (Ben Salah *et al.*, 2000). O uso de outros fármacos em associação ou como alternativa aos antimoniais não se tem revelado bem sucedido, seja por baixa eficiência terapêutica ou por alta incidência de toxicidade e efeitos adversos.

Estes fatos evocam a urgente necessidade da descoberta de novas e eficientes alternativas terapêuticas para a leishmaniose.

2.4. DOENÇA DE CHAGAS

2.4.1. Etiologia e Transmissão

A doença de Chagas é causada por protozoário flagelado, o *Trypanosoma cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Trata-se de parasitose tecidual e hematológica, endêmica em várias regiões da América Latina (de Souza, 1999).

O ciclo do agente etiológico compreende o hospedeiro humano e o inseto vetor, triatomíneo de várias espécies, sendo o *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Triatoma brasiliensis* os mais importantes. São conhecidos vulgarmente como barbeiros ou chupanças (de Souza, 1984).

Tripanossomos possuem componentes celulares típicos de eucariotos, diferenciando-se, apenas, por apresentarem mitocôndria única, flagelo e uma organela característica denominada cinetoplasto, localizada na base do flagelo (de Souza, 1999).

O flagelo dos tripanossomos está envolvido, no mínimo, em dois importantes processos biológicos: movimento da célula e aderência às superfícies de células hospedeiras e das células do trato gastrintestinal do hospedeiro invertebrado (Farina *et al.*, 1986; Mortara *et al.*, 1999).

O cinetoplasto corresponde à condensação de DNA extracelular, em região bem definida da mitocôndria, e forma estrutura arredondada logo após a base do flagelo. Este DNA constitui de 20 a 25% do DNA total do parasito. São moléculas organizadas e associadas entre si sob a forma de miniesferas e macroesferas, as últimas responsáveis pela síntese de proteínas do metabolismo do parasito (Mortara *et al.*, 1999).

Durante seu ciclo biológico, o *T. cruzi* passa por diferentes estágios de desenvolvimento, os quais são identificados pela posição relativa do cinetoplasto (Miles, 1999).

A forma tripomastigota é encontrada na corrente sanguínea de hospedeiros vertebrados infectados. Seu cinetoplasto é encontrado na extremidade posterior do parasito e, portanto, em posição oposta ao núcleo. O flagelo emerge próximo ao cinetoplasto. Esta forma não sofre processo de divisão celular (Miles, 1991).

Variante deste estágio é a forma tripomastigota metacíclica encontrada nas fezes do vetor, sendo esta a forma infectante (Miles, 1991).

A forma encontrada no estômago do vetor é denominada epimastigota. Nesta, o cinetoplasto e o flagelo são encontrados na extremidade anterior do parasito, próximos ao núcleo.

Por fim, as formas encontradas nos tecidos do hospedeiro vertebrado são as amastigotas. Possuem forma arredondada e o flagelo bastante curto é praticamente invisível. São as formas de multiplicação intracelular.

A transmissão se dá por meio das fezes dos insetos vetores, durante seu repasto sanguíneo. Os tripomastigotas metacíclicos, eliminados pelas fezes, penetram no hospedeiro vertebrado pelo local da picada ou através dos olhos. No organismo transformam-se em amastigotas, multiplicam-se e passam ao sangue sob a forma de tripomastigotas. Há, em seguida, a contaminação de músculos e outros tecidos. O ciclo se fecha com a ingestão do sangue por outro triatomíneo. A figura 19 esquematiza o ciclo evolutivo do *T. cruzi* (Contreras *et al.*, 2002).

Figura 19. Ciclo biológico do *T. cruzi*.

Adaptado de [http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/lifecycles/trypanosoma_lifecycle.html]

A doença também pode ser transmitida por meio de contatos acidentais com sangue contaminado, transfusão sanguínea ou transplante de órgãos que carreguem formas tripomastigotas, e ingestão oral.

Até pouco tempo a transmissão através de sangue de doadores infectados preocupava a comunidade médica e os serviços de saúde pública (Dias, Brener, 1989; Wendel, 1998). Entretanto, os avanços da tecnologia diagnóstica em hemocentros têm acarretado o controle desta via de transmissão (WHO, 2005).

Também a transmissão via vetor tem sido controlada com sucesso no Brasil nos últimos anos (WHO, 2005). Contrariando as expectativas, entretanto, o número de novos casos continua estável e não diminuindo. Outras formas de contaminação podem, então, ser responsáveis por novos casos.

A via oral tem sido sugerida desde que episódios agudos da doença foram observados em áreas isentas de vetores domiciliares do *T. cruzi*. Esta transmissão ocorre pela ingestão de

alimentos contaminados pelas fezes de triatomíneos silvestres ou domiciliares. Estudos recentes vêm demonstrando que os parasitos exibem alta patogenicidade e capacidade de penetrar através da membrana do trato gastrointestinal além de resistir aos líquidos do suco gástrico (Shikanai-Yasuda, 1991; Pinto *et al.*, 2001). Esta resistência ao suco gástrico parece estar correlacionada com a cepa do parasito, não sendo todas elas capazes de exibir tal característica (Camandaroba, Lima, Andrade, 2002).

2.4.2. Mecanismos invasivos

Como patógeno intracelular obrigatório que infecta uma ampla variedade de células nucleadas, o parasito invade a célula hospedeira, sendo encontrado, inicialmente, em vacúolo endocítico (Milder, Kloetzel, 1980).

Os mecanismos invasivos deste parasito ainda não estão totalmente elucidados.

No caso do *T. cruzi* existem evidências de que, tanto em células fagocíticas quanto nas não fagocíticas, há a fusão de lisossomos ao vacúolo contendo o parasito produzindo o que se conhece como vacúolo parasitóforo (Milder, Kloetzel, 1980). Entretanto, as formas tripomastigotas são capazes de irromper a membrana deste vacúolo e evoluírem para amastigotas no citossol (Brenner 1973). As formas amastigotas dividem-se no citossol e evoluem a tripomastigotas, que, após lise da célula hospedeira, são liberadas na corrente sanguínea.

Atualmente, sabe-se que um sub-ciclo alternativo de evolução pode ocorrer no hospedeiro vertebrado. Amastigotas, originadas ou de lise prematura de células infectadas (Behbehani, 1973; Umezawa *et al.*, 1985) ou de diferenciação extracelular de tripomastigotas (Pan, 1978; Ley *et al.*, 1988) invadem células fagocíticas ou não. Dentro destas células os amastigotas podem sobreviver e sustentar o ciclo evolutivo do parasito. Estas formas infectantes de amastigotas são morfológica, imunológica e bioquimicamente semelhantes às formas intracelulares de amastigotas (Villalta, Kierszenbaum, 1984).

Mortara e colaboradores (1991) observaram que amastigotas extracelulares são capazes de infectar células HeLa por interagirem com microvilosidades da superfície dorsal destas células. Por outro lado, tripomastigotas preferencialmente invadem células HeLa por suas extremidades evidenciado, assim, que diferentes formas do parasito interagem com regiões específicas na superfície da célula hospedeira.

Pode-se concluir, então, que os mecanismos envolvidos no processo invasivo dependem tanto do tipo de célula hospedeira quanto da forma infectante em questão (Mortara *et al.*, 1999).

2.4.3. Patogenia (Rey, 1991)

Do ponto de vista clínico, a doença de Chagas caracteriza-se por duas fases, a aguda e a crônica, e um estágio intermediário, assintomático.

Em adultos, a fase aguda pode não ser detectada. Ela geralmente aparece em crianças menores de 10 anos de idade, com índices de mortalidade elevados. Durante esta fase da infecção, ocorre reação inflamatória localizada. Desenvolve-se um nódulo subcutâneo, conhecido como “chagoma”, edemaciado devido à infiltração de fluidos e grande número de macrófagos como resposta do sistema imunológico contra o parasito. Este nódulo pode persistir por 2 a 3 meses.

Quando a infecção ocorre através dos olhos, o paciente apresenta edemaciamento e conjuntivite unilateral conhecidos como “sinal de Romaña” (Figura 20).

Figura 20. Sinal de Romaña característico em crianças na fase aguda da doença.
Fonte: <http://www.hhmi.ucla.edu/C168/week4/lecture1.html>

Em formas graves, é possível o aparecimento de miocardite, com taquicardia e outras alterações de ritmo, aumento da área cardíaca e sinais de insuficiência circulatória, entre outros.

A fase intermediária pode perdurar por muitos anos. Assintomática, nela não são encontrados tripomastigotas no sangue, mas anticorpos contra *T. cruzi* estão presentes.

Aproximadamente 10 a 30% dos pacientes progridem da fase indeterminada para o estágio crônico da parasitose. Nesta, os níveis de parasito no sangue são bastante baixos. As manifestações nesta fase são mais graves incluindo cardiopatia em 27% dos casos, megacólon e megaesôfago, correspondendo a 6% dos casos, e manifestações neurológicas, referentes a 3% dos casos. Os pacientes podem piorar progressivamente, vindo a óbito, especialmente como resultado da insuficiência cardíaca (Ferreira, 1997).

Os mecanismos de patogênese da doença de Chagas são explicados com base em duas principais teorias (Tarleton, 2001):

- × teoria da persistência do parasita, pela qual a persistência do *T. cruzi* em locais específicos do hospedeiro resulta em reação inflamatória crônica. Baseia-se em duas

evidências. A primeira de que focos inflamatórios são encontrados sempre próximos a locais onde se encontram parasitas e, a segunda, de que tratamentos que diminuem a carga parasitária levam, também, à diminuição dos sintomas. É a mais aceita atualmente (Zhang, Tarleton, 1999).

× teoria da autoimunidade, pela qual a infecção por *T. cruzi* acarreta respostas imunes contra os tecidos do próprio organismo independentemente da persistência do parasito neste. O principal suporte para a hipótese da autoimunidade é a conclusão de que sinais da doença são evidentes em tecidos onde há aparente ausência de parasitos (Kierszenbaum, Hudson, 1985).

A importância de se descobrir as bases da patogênese da doença de Chagas incide sobre o tratamento adequado a ser escolhido. Pela primeira teoria, a doença seria uma parasitose e, desta maneira, a administração de quimioterápicos seria a escolha terapêutica adequada. Já pela segunda, a doença seria auto-imune e como tal, deveria ser tratada (Andrade *et al.*, 1997).

Entretanto, mesmo que a doença de Chagas tenha componentes auto-imunes, tratamentos imunossupressores seriam impraticáveis. A infecção pelo *T. cruzi* deve ser tratada como parasitose com o objetivo primário de aumentar a resposta imune e reduzir a carga parasitária (Andrade *et al.*, 1997).

2.4.4. Tratamento

Apesar da importância epidemiológica e médico-social da parasitose, o número e a qualidade dos quimioterápicos disponíveis é totalmente insuficiente (Ferreira, 1997).

Nifurtimox e benznidazol são os únicos antichagásicos de uso terapêutico, ativos na fase aguda e de baixa atividade na fase crônica. No Brasil, apenas o benznidazol encontra-se na terapêutica: o nifurtimox foi retirado em razão dos efeitos tóxicos, mais graves que os do primeiro, associado à baixa eficácia nas cepas brasileiras (Korolkovas, 2004).

O nifurtimox, derivado 5-nitrofurânico, é mais ativo contra as cepas argentinas e chilenas do tripanossomo e muito mais efetivo na fase aguda da doença. Inibe tanto tripomastigotas quanto amastigotas (Ross, 1980; Korokolvas, 1988).

O benznidazol (derivado 2-nitroimidazol) é considerado fármaco de escolha para tratamento das tripanossomíases brasileiras (Ross, 1980; Korokolvas, 2004).

Esses compostos apresentam mecanismo de ação citotóxica, que inicialmente envolve uma ou mais reações de redução do grupo nitro, seguidas por inibições de várias enzimas que são necessárias às exigências energéticas da célula do parasita (DoCampo, Moreno, 1985; DoCampo, 1990; Gringauz, 1997).

A redução do grupo nitro leva à produção de radicais livres bastante danosos para as células, podendo interagir com vários componentes celulares e propagar seus efeitos deletérios. Isso é particularmente verdadeiro no caso do *T. cruzi* devido à sua deficiência de catalase e glutatona peroxidase, o que torna o parasita extremamente vulnerável ao peróxido de hidrogênio. As células dos mamíferos, ao contrário, têm várias enzimas, como catalase, peroxidase e superóxido dismutase, que previnem o efeito letal dos radicais livres (DoCampo, Moreno, 1985; Korolkovas, 1988; Tshako *et al.*, 1989; DoCampo, 1990; Gringauz, 1997).

O mecanismo de ação completo de nitroderivados é abordado no item 2.7 deste texto.

2.4.5. Epidemiologia

O *T. cruzi* pode ser encontrado numa ampla área da América, da latitude 42N até a 46S, embora a distribuição dos vetores selvagens e reservatórios seja muito maior que a distribuição da doença humana. A “domiciliação” dos triatomíneos expõe cerca de 100 milhões de pessoas ao risco de infecção, do sul dos Estados Unidos da América até a província de Chubut, Argentina (WHO, 2000b). Entretanto, as melhores condições de vida da população norte-americana e as condições das espécies locais de triatomíneos fazem com que a infecção humana pelo vetor seja extremamente rara nos EUA. Porém, face à intensa migração do México e América Central para os EUA, há, atualmente, cerca de 100.000 pessoas infectadas neste último (Nickerson *et al.*, 1981; Grant *et al.*, 1989).

Nos 21 países endêmicos, estima-se que de 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita e que ocorram, aproximadamente, 50.000 mortes causadas pela doença de Chagas a cada ano (WHO, 2004d). A Figura 21 mostra a distribuição geográfica da parasitose, segundo dados da OMS de 1996.

Figura 21. Distribuição da doença de Chagas.

Fonte: <http://www.cdfound.to.it/HTML/tc2.htm>

No Brasil, a doença dissemina-se por área de 3,5 milhões de km², envolvendo 2.450 municípios e deixando sob risco 35 milhões de pessoas (Dias, 1994). Até 1992, os dados do inquérito sorológico nacional estimavam prevalência de cerca de 5 milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi* (Dias, Jatene, 1992). Estas compreendiam, em sua maioria, indivíduos de origem rural e pertencentes aos níveis sócio-econômicos mais baixos, contaminados pelo contato com fezes infectadas de triatomíneos. Estima-se que cerca de 300.000 pessoas encontravam-se infectadas na cidade de São Paulo e mais de 200.000 no Rio de Janeiro por via transfusional, uma vez que a transmissão vetorial foi controlada e inibida através de contínuos e intensivos Programas de Saúde Pública (Dias, 1992).

A morbi-mortalidade da doença de Chagas no Brasil é significativa, vitimando 20% ou mais dos indivíduos infectados, que adquirem cardiopatia chagásica crônica evolutiva, capaz de matar, no mínimo, 15.000 pessoas/ano em nosso País (Dias, Jatene, 1992). Uma vez que a fase aguda não é facilmente detectada, a mortalidade de 8% não foi mais considerada relevante frente à fase crônica. As formas digestivas continuam importantes, especialmente no Brasil Central, acometendo entre 5% e 15% dos infectados crônicos (Dias, 1990; Dias, Jatene, 1992).

A doença de Chagas não é um problema isolado da população latino-americana. Nas áreas endêmicas, está intimamente relacionada com as doenças “sociais” típicas, como desnutrição, diarreia, tuberculose e outras parasitoses. O risco de contrair a doença de

Chagas está diretamente relacionado à pobreza: o inseto triatomíneo que transmite o parasita se alimenta de sangue e encontra ambiente favorável em frestas de paredes e telhados de habitações pobres em áreas rurais e em favelas localizadas na periferia urbana (WHO, 2000b).

A descoberta da capacidade do *T. cruzi* em ser transmitido via oral, entretanto, levanta a possibilidade de disseminação da doença para centros urbanos ricos e isentos de triatomíneos. Daí a importância dos estudos relacionados à transmissão via oral e de elucidação dos mecanismos de resistência do parasito ao ambiente gástrico hostil, os quais proverão informações para novas estratégias de controle da doença.

2.5. INTRODUÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS POR MEIO DE OTIMIZAÇÃO DE PROTÓTIPOS

Atualmente, as pesquisas de novos fármacos têm se baseado na avaliação da estrutura química de compostos e no desenvolvimento de substâncias análogas, visto que a obtenção de estruturas completamente novas dispense grande investimento de tempo e dinheiro (Patrick, 1995; The International QSAR and Modelling Society, 2000).

Devido ao desenvolvimento da biologia molecular e da genética, número cada vez maior de novos alvos tem sido identificado. Ao mesmo tempo, a implementação de metodologias sintéticas, analíticas e computacionais cada vez mais modernas tem determinado o aumento de protótipos potenciais a serem otimizados para tratamento contra ampla gama de enfermidades (Williard *et al.*, 1996).

Algumas das características a serem consideradas para a otimização incluem a potência, a seletividade e problemas farmacocinéticos (Figura 22).

Figura 22. Características que podem ser alteradas na otimização de protótipos.

A otimização de protótipos é uma das etapas mais desafiadoras na pesquisa por novos fármacos. Isto porque, nesta fase, o objetivo é, fundamentalmente, transformar molécula de atividade biológica promissora em fármaco eficaz e seguro. Para tanto, é necessário o

conhecimento e a associação de diferentes abordagens científicas e tecnológicas (Wess, Urmann, Sickenberger, 2001).

Dentre tais metodologias, merece realce a modificação molecular (Krogsgaard-Larsen, Liljefors, Madsen, 1996; Kubinyi, 1993). Esta compreende processos gerais e especiais, pelos quais podem-se obter análogos e derivados com características farmacológicas, farmacocinéticas ou farmacodinâmicas aprimoradas.

Pelos processos gerais é possível a associação de moléculas por meio de ligações fracas ou de ligações covalentes. Estão inseridas neste contexto a adição molecular - associação de duas moléculas diferentes por meio de ligações fracas, a replicação molecular - associação de duas ou mais moléculas idênticas por meio de ligações covalentes, a hibridação molecular - associação de moléculas diferentes mediante ligações covalentes e o processo de simplificação molecular, em que uma molécula protótipo é modificada para se obter derivados menos complexos estruturalmente (Wermuth, 2003a).

Ainda dentro dos processos gerais cabe citar a latenciação, tipo de modificação molecular, que consiste em um dos processos mais profícuos, compreendendo ampla gama de processos por meio dos quais se produz forma de transporte inativa do fármaco, que, *in vivo*, mediante processos enzimáticos e/ou químicos libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele (Bundgaard, 1985; Bundgaard, 1991; Friis, Bundgaard, 1996; Chung, Ferreira, 1999; (Wermuth, 2003a; Ettmayer *et al.*, 2004; Testa, 2004) (Figura 23).

Figura 23. Representação esquemática do conceito de pró-fármaco. Adaptado de Bundgaard, 1991.

Já os processos especiais compreendem alterações mais complexas na estrutura do protótipo. Podem interferir com a estrutura do mesmo, alterando sua flexibilidade, suas dimensões e até mesmo suas propriedades físico-químicas (Kubinyi, 1993).

Destes processos, o bioisosterismo (Patani, LaVoie, 1996; Wermuth, 2003b) é dos mais aplicados com vistas à obtenção de derivados com mesma atividade, ainda que antagônica. Em seu conceito mais amplo, compreende a substituição, em moléculas bioativas,

de um átomo ou grupos de átomos por outros que apresentam arranjos estéricos e/ou eletrônicos comparáveis.

Já entre os métodos empíricos de otimização de um composto protótipo estão as relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica, o QSAR (Kubinyi, 1993; Network science, 2000). Desta análise derivam modelos que descrevem a dependência da atividade biológica de características estruturais da molécula, por meio de parâmetros físico-químicos -- análise de Hansch (Hansch, Leo, 1995), Craig (Craig, 1971) e diagrama de Topliss (Topliss, 1997), para citar alguns -- ou de variáveis indicadoras que representam diferentes características estruturais, como a análise de Free-Wilson (Kubyni, 1993), ou de propriedades tridimensionais da molécula --3D-QSAR (CoMFA) (Taylor , Kennewell, 1993).

2.5.1. Metodologia de Topliss (Topliss, 1972)

Entre os métodos de otimização do padrão que fazem parte do chamado QSAR clássico, ou 2D-QSAR, o de Topliss tem a vantagem de indicar o análogo de maior atividade em número de etapas bastante reduzido, sem exigir determinações quantitativas da atividade biológica, requisito que freqüentemente inviabiliza estudos de Relação Estrutura-Atividade abordando seu aspecto quantitativo (Wermuth, 1984).

Mediante tal metodologia, cada análogo é sintetizado e testado, orientando a escolha do próximo composto, por meio da comparação entre as atividades biológicas dos dois últimos analisados. Esta estratégia é fundamentada na influência de propriedades físico-químicas de grupos substituintes sobre a atividade biológica observada e baseia-se no diagrama de Craig (Craig, 1971).

Neste diagrama, os substituintes são dispostos graficamente e de acordo com suas contribuições hidrofóbicas e eletrônicas para o sistema. Para tanto, utilizam-se parâmetros físico-químicos conhecidos como σ e π , que representam valores numéricos para contribuições eletrônicas e hidrofóbicas, respectivamente (Craig, 1971). Valores positivos de π representam acréscimos na lipofilicidade da molécula. Valores negativos do mesmo parâmetro, entretanto, indicam diminuições de lipofilicidade do sistema. Quanto às contribuições eletrônicas, valores positivos de σ indicam substituintes capazes de retirar elétrons do sistema enquanto que valores negativos de σ representam a contribuição de substituintes doadores de elétrons para o sistema.

Topliss (1972) aplicou este diagrama elaborado por Craig para a construção de sistema de escolha de substituintes tanto para sistemas aromáticos quanto para cadeias laterais em sistemas alifáticos. A escolha dos substituintes se dá de acordo com uma árvore de decisão e não requer múltiplas análises de regressão (Figura 24).

Figura 24. Diagrama de Topliss.
Fonte: Topliss, 1972

O esquema de Topliss para substituintes em anéis aromáticos parte do protótipo e de um análogo 4-cloro substituído. A atividade biológica do análogo 4-cloro substituído pode ser maior, menor ou igual à do protótipo não substituído.

No primeiro caso (maior atividade), o substituinte cloro possui valores positivos de σ e π , o que implica assumir que ou a hidrofobicidade ou a capacidade de receber elétrons são importantes para a atividade biológica. Se ambas são importantes, então a adição de um segundo átomo de cloro, agora na posição 3 do anel aromático, deveria aumentar a atividade biológica. Quando isto é confirmado pelos testes biológicos, então os substituintes são variados para aumentar os valores de σ e π . Se pelo contrário, a atividade obtida é menor ou igual, pode-se dizer que interação estérica desfavorável ou hidrofobicidade excessiva tenha ocorrido. As modificações seguintes irão testar, então, a importância relativa dos fatores estéricos e de π .

No caso de o análogo 4-cloro substituído apresentar atividade biológica menor que a do protótipo, pode-se concluir que valores de σ e π negativos são importantes para a atividade biológica ou que substituintes na posição 4 do anel aromático são estericamente desfavoráveis.

O próximo passo, então, é utilizar um substituinte com valores negativos de σ e π (por exemplo 4-OMe). Para este novo análogo também é realizado o teste biológico. Se a atividade aumenta, as próximas modificações na estrutura dos análogos deverão testar a importância relativa dos fatores σ e π . Por outro lado, se o análogo 4-OMe substituído não apresenta atividade biológica aumentada, deduz-se que isto seja devido a um fator estérico desfavorável e o próximo substituinte a ser escolhido será um grupo 3-cloro.

O último caso a ser analisado é quando a atividade biológica do análogo 4-cloro substituído não se altera com relação à atividade do protótipo. Nesta situação poder-se-ia concluir que o aumento da atividade biológica requer valores positivos de π e valores negativos de σ . Uma vez que o átomo de cloro possui valor positivo de π , o efeito potencializador da atividade exercido por este substituinte teria sido cancelado em detrimento dos valores positivos de σ . O próximo substituinte a ser estudado, neste caso, será o 4-metila, que possui valor positivo de π e valor negativo para σ . Se ainda assim a atividade não aumentar, conclui-se que ocorre efeito estérico desfavorável na posição 4 do anel aromático e o substituinte 3-cloro é a próxima escolha. As modificações seguintes irão explorar variações nos fatores σ e π .

2.5.2. Relação estrutura química e atividade biológica quantitativa – QSAR (Kubinyi, 1993)

Especialmente nas primeiras fases do processo de introdução de novos fármacos na terapêutica, tanto o QSAR-2D quanto o QSAR-3D mostram-se úteis para a seleção de compostos promissores com base em modelos matemáticos, que revelam a importância relativa dos diferentes parâmetros capazes de interferir com a atividade biológica exibida por determinada molécula.

Hansch, em 1967, introduziu o QSAR clássico, que consiste, basicamente, no estabelecimento de modelos matemáticos que correlacionam a atividade biológica com parâmetros físico-químicos. O método multi-paramétrico ou análise extratermodinâmica, como também é denominado, pode ser assim resumido;

$$\text{Atividade Biológica} = f(\text{parâmetros hidrofóbicos}) + f(\text{parâmetros eletrônicos}) + f(\text{parâmetros estéreos}) + f(\text{outros parâmetros}) + \text{correção}.$$

A análise de Free-Wilson, metodologia matemática aplicada em QSAR, introduziu, após adaptações, o uso de variáveis indicadoras, independentemente de propriedades físico-químicas. Em geral, as variáveis indicadoras são empregadas conjuntamente aos parâmetros

físico-químicos, constituindo o método misto Hansch-Free-Wilson. Tal método permite comparar, em um só modelo, séries análogas, como por exemplo, aquelas oriundas de isômeros ópticos. Atribui-se arbitrariamente o valor 1 à variável independente que compreenda determinada característica e zero, àquela que não contenha essa mesma característica (Free, Wilson, 1964; Hansch, Calef, 1975).

Baseados nas experiências das aplicações que se seguiram à introdução do QSAR, Unger e Hansch (1973) definiram regras para a derivação de equações de QSAR-2D. São estas:

- × **Seleção das variáveis independentes:** ampla variedade de parâmetros físico-químicos deve ser utilizada. Tais parâmetros descrevem, em termos numéricos, as contribuições hidrofóbicas, estéricas e eletrônicas de grupos químicos e/ou átomos para as características gerais da molécula. Interferem, portanto, com a atividade biológica das mesmas. Devem ser essencialmente independentes, isto é, não devem estar correlacionados entre si, o que é dado, estatisticamente, por coeficientes de correlação cruzada entre variáveis menor que 0,6 - 0,7.
- × **Justificativa da escolha das variáveis independentes e validação:** todo parâmetro deve ser escolhido de forma racional e ser validado por método estatístico apropriado, por exemplo, por validação cruzada. As melhores equações são as que apresentam todos os termos da equação significativos, indicado por intervalo de confiança de 95% dado por teste seqüencial F, e menor desvio padrão.
- × **Princípio da parcimônia:** quando mais de uma equação descrever o modelo de forma confiável e significativa, deve-se optar pela equação mais simples, ou seja, com menor número de descritores.
- × **Número de termos:** deve-se utilizar um parâmetro para cada grupo de cinco ou seis dados biológicos. Para base de dados pequenas, maior número de parâmetros pode ser utilizado se estes constituírem um modelo racional. Já para base de dados maiores (mais de 30 dados), deve-se utilizar o princípio da parcimônia, visto que esta regra leva a derivação de modelos com muitas variáveis.
- × **Modelos qualitativos:** é importante que o modelo obtido seja consistente com princípios físico-químicos, biológicos e/ou bioquímicos conhecidos do processo em estudo.

2.5.2.1. *Tratamento estatístico* (Barros Neto, Scarminio, Bruns, 2002)

A aplicação da metodologia de Hansch-Free Wilson resulta, como visto, em equação matemática que correlaciona quantitativamente a atividade biológica com parâmetros físico-químicos. Estas equações, também chamadas “modelos”, são obtidas, em geral, por análise de regressão. Por esta, os dados são distribuídos graficamente e analisa-se a possível correlação entre eles. Assim, em casos de correlações lineares, uma reta pode ser traçada pelos pontos obtidos, enquanto que as correlações não-lineares são descritas por curvas que passam pelos pontos.

Na realidade, entretanto, a reta ou curva que descreve a correlação existente não passa exatamente por todos os pontos. Esta representação gráfica sempre deixará resíduos em relação a algumas das observações. Estes resíduos podem ser positivos ou negativos, conforme os pontos estejam acima ou abaixo da reta ou curva traçada (Barros Neto, Scarminio, Bruns, 2002).

O melhor modelo é o que minimiza a distância global dos pontos em relação à reta ou curva. Para a reta isto normalmente é obtido por ajuste dos mínimos quadrados, ou seja, ajuste matemático tal que a soma dos quadrados desses resíduos seja mínima. A análise de regressão compreende esses tratamentos.

A qualidade e a capacidade preditiva do modelo obtido deve ser verificada através da análise de conjunto de parâmetros que expressem a validade estatística da regressão. Alguns parâmetros que devem constar na análise são descritos a seguir.

O número de compostos (n) ou dados a serem trabalhados em estudos estatísticos determina a qualidade dos mesmos. Estudos estatísticos envolvendo amostragem pequena, ou seja, pequeno número de elementos analisados levam a estudos que incorrem em alto índice de erros, pois os dados escolhidos aleatoriamente não são suficientes para representar, adequadamente, a população total. Assim, o número de elementos utilizados nos estudos deve ser grande o suficiente para representar bem a população total, mas não tão grande que dispense a aplicação de estudos estatísticos, por exemplo, quando englobam a população completa.

O coeficiente de correlação expressa o grau de associação linear entre duas variáveis aleatórias X e Y . Este valor deriva do conceito de covariância, a qual expressa como duas variáveis se comportam uma com relação à outra, ou seja, se as variações de X e Y se relacionam direta ou indiretamente. É expressa matematicamente pela equação 1.

Equação 1:

$$\text{Cov}(X,Y) = [1/(n-1) \cdot \sum (x_i - x_m) \cdot (y_i - y_m)]$$

onde: n = número de elementos na amostra,

x_i e y_i = cada elemento X e Y dado

x_m e y_m = médias dos valores X e Y, respectivamente

Entretanto, o valor da covariância depende da escala utilizada para medir X e Y, o que torna difícil comparar o grau de associação estatística existente em diferentes pares de variáveis aleatórias. Assim, utiliza-se o recurso matemático de aplicar um fator de escala, dividindo-se o desvio de cada dado pelo desvio padrão da variável correspondente (Barros Neto, Scarminio, Bruns, 1995). A equação 2 descreve o coeficiente de correlação matematicamente.

Equação 2:

$$r(X,Y) = [1/(n-1)] \cdot \sum [(x_i - x_m)/s_x] \cdot [(y_i - y_m)/s_y]$$

onde: n = número de elementos na amostra,

x_i e y_i = cada elemento X e Y dado

x_m e y_m = médias dos valores X e Y, respectivamente

s_x e s_y = desvios padrões amostrais das variáveis X e Y, respectivamente.

Esta espécie de covariância “normalizada” é chamada de coeficiente de correlação e tem maior aplicabilidade em análises estatísticas que a própria covariância. Refletindo a aplicação deste tratamento matemático, os valores de coeficiente de correlação estão restritos ao intervalo [-1, 1]. Quanto mais próximo de 1 o valor de r, maior a correlação entre as variáveis da mesma forma que valores próximos a -1 indicam a completa falta de correlação entre as mesmas.

O desvio padrão, s, é a medida absoluta da qualidade de ajuste do modelo (Kubinyi, 1993). Este valor diz o quanto cada dado está desviando do valor médio, para valores mais altos ou mais baixos. Quanto menor este número melhor o ajuste da reta, ou seja, menor a distância global dos pontos em relação à reta ou curva.

Os estudos estatísticos envolvem também a distribuição de dados, segundo sua frequência, em torno do valor médio das observações. A partir destas distribuições podem ser estipulados *intervalos de confiança*, ou seja, intervalos da distribuição que representem, com confiança, x% da população.

O coeficiente de significância de Fisher (F) é uma medida de significância estatística do modelo dada pela distribuição dos dados quando se comparam variâncias de diferentes populações ou quando se trabalha com médias de dados, como no caso dos estudos de QSAR-2D(Kubinyi, 1997).

Para que o modelo possa ser aplicado para prever atividades de novos compostos é necessário considerar parâmetros estatísticos associados à validação do estudo estatístico como coeficientes de correlação cruzada q^2 e o desvio padrão da validação cruzada, s_{press} . Estes dois parâmetros são similares aos coeficientes de correlação e desvio padrão anteriormente definidos mas são aplicados de forma a se obter informações sobre a qualidade preditiva do modelo(Kubinyi, 1993; Kubinyi, 1997).

Também é importante considerar a significância dos coeficientes resultantes da análise de regressão. Estas informações são dadas pelos erros que acompanham estes coeficientes e também o termo constante da equação de QSAR. Estes erros geralmente são expressos dentro de intervalos de confiança de 95% e não devem ser maiores ou iguais aos valores absolutos destes coeficientes.

Todos estes parâmetros devem ser considerados conjuntamente. A análise individual destes pode levar a interpretações errôneas sobre um dado conjunto de dados as quais não correspondem à real situação.

Em geral, o modelo é aceito quando possui um coeficiente de correlação $r \geq 0,90$ para ensaios *in vitro* e $r \geq 0,80$ para ensaios *in vivo*; o desvio padrão, s , da correlação não deve ser maior do que o desvio padrão dos dados biológicos, não podendo ser superior a 0,3 para testes *in vivo*, e a variação de cada termo da equação não pode ultrapassar o valor absoluto do próprio coeficiente (Tavares, 2004).

É importante ressaltar, no entanto, que a análise estatística não deve se sobrepor ao sentido biológico do modelo.

2.5.2.2. Parâmetros utilizados em QSAR-2D (Kubinyi, 1993)

Nas últimas quatro décadas todo tipo de combinações de parâmetros lipofílicos, eletrônicos e estéricos, com ou sem variáveis indicadoras, tem sido utilizado e correlacionado a valores de atividade biológica de forma linear ou não linear.

São de especial importância os parâmetros relacionados às forças intermoleculares envolvidas nas interações fármaco-receptor bem como no transporte e distribuição. Os parâmetros mais utilizados são (Tavares, Ferreira, 2002):

- ✱ parâmetros de lipofilicidade: coeficientes de partição ($\log P$), parâmetros cromatográficos (como $\log k'$, R_m) e constante de hidrofobicidade de Hansch (π), constante de fragmento (f);
- ✱ parâmetros de polarizabilidade: refratividade molar (MR), volume molar (MV) e parachor;
- ✱ parâmetros eletrônicos: constante de Hammett (σ), parâmetros de ressonância e de campo de Swain e Lupton ($\mathcal{R}$ e $\mathcal{J}$), constantes de transferência de carga, momento de dipolo e parâmetros quânticos (como HOMO e LUMO),
- ✱ parâmetros estéricos: derivados de relações de energia livre ou de considerações geométricas, como STERIMOL, de Verloop.
- ✱ outros parâmetros como, por exemplo, topológicos: conectividade molecular

2.5.2.2.1 Parâmetros de lipofilicidade

Lipofilicidade é propriedade definida como a partição de um composto entre duas fases, uma aquosa e a outra não-aquosa ou orgânica. O coeficiente de partição ($\log P$) é definido como proporção ou relação das concentrações de uma dada substância na fase orgânica e na fase aquosa de um sistema de dois compartimentos em equilíbrio. Na maioria dos ensaios de determinação de $\log P$, os sistemas utilizados na medição são constituídos de água e *n*-octanol por ser este o sistema que melhor mimetiza as membranas orgânicas.

A constante de hidrofobicidade de Hansch, (π), como visto anteriormente, reflete valores numéricos para as contribuições hidrofóbicas de diferentes substituintes.

R_m , parâmetro hidrofóbico obtido por cromatografia em camada delgada de fase reversa eluída em diferentes fases móveis, leva em conta R_f , que é a relação entre eluição da substância e a do solvente, através da equação $R_m = \log(1/R_f - 1)$.

Já os valores de $\log k'$ são obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e são calculados a partir de valores de tempo de retenção do composto (t_r) e tempo de retenção do solvente (t_0) por meio da equação $k' = (t_r - t_0)/t_0$.

A constante de fragmento f , como a constante π , é uma medida de contribuição hidrofóbica absoluta correspondente a um substituinte ou grupo, cujo cálculo não se baseia na diferença entre composto substituído e composto não substituído, como no caso de π , mas sim a partir dos valores de $\log P$ medidos. Assim, pela equação: $\log P = \sum a_i \cdot f_i$ onde a_i = número de ocorrências do fragmento com contribuição hidrofóbica e f_i a própria constante.

2.5.2.2.2 Parâmetros de polarizabilidade

Entre os parâmetros de polarizabilidade destaca-se a refratividade molar, a qual está correlacionada com volume molar, distribuição estérica do grupo e hidrofobicidade. É dada pela equação: $MR = MV \cdot n^2 - 1/n^2 + 2$ onde n é o índice de refratividade. É denominada parâmetro “camaleão”, por representar, a um só tempo, contribuição estérica e hidrofóbica.

2.5.2.2.3 Parâmetros eletrônicos

Os parâmetros eletrônicos são muito utilizados em estudos de QSAR. Além do tradicional σ de Hammett, também são comuns os parâmetros de ressonância e de campo de Swain e Lupton. Estes dois parâmetros derivaram da divisão da constante de Hammett em dois componentes: contribuições por efeitos indutivos (Field, $\mathcal{F}$) e por efeito de ressonância (Resonance, $\mathcal{R}$).

Parâmetros quânticos também são utilizados, como valores de energia dos orbitais HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) e LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) as quais refletem tendências reacionais das moléculas em estudo.

Parâmetros de transferência de carga, momentos de dipolo e até mesmo valores de pKa podem ser utilizados como indicadores de contribuições eletrônicas de substituintes.

2.5.2.2.4 Parâmetros estéricos

Parâmetros estéricos constituem-se em caso a parte dentro de estudos de QSAR-2D, visto que tais contribuições são mais bem visualizadas em estudos de QSAR-3D.

Parâmetros como E_s , de Taft, ou E_s corrigida por Hancock, que se constituem em parâmetros de grupo, falham em expressar a contribuição estérica de substituintes. Ainda assim, medidas de comprimento de átomos ou grupos substituintes (L) e as mesmas dimensões aplicadas sob a forma de vetores e, portanto, contendo informações sobre direção e ângulos (B_1 , B_2 , B_3 e B_4), constituem o conjunto de parâmetros conhecido como STERIMOL, introduzido por Verloop, que são os mais confiáveis e utilizados em estudos de QSAR-2D abrangendo aspectos estéricos.

2.5.2.2.5 Outros parâmetros

A conectividade molecular (χ) é parâmetro topológico calculado a partir da fórmula molecular do composto que descreve formas tridimensionais baseados em cálculos gráficos.

Por se basear na fórmula molecular, descreve diferenças topológicas de isômeros de cadeia com alta precisão. Parâmetros como coeficiente de partição, refratividade molar, e propriedades estéricas estão intimamente relacionados a este parâmetro.

Outro parâmetro que pode ser utilizado nos estudos de QSAR é a variável indicadora, que independe de propriedades físico-químicas e descreve ausência ou presença de determinada característica. Atribui-se arbitrariamente o valor 1 à variável independente que compreenda determinada característica e zero, àquela que não contenha essa mesma característica (Free, Wilson, 1964; Hansch, Calef, 1975).

2.4.2.3. Relações não lineares entre estrutura química e atividade biológica

Relações não lineares entre estrutura química e atividade biológica são comuns. No geral, estas ocorrem devido ao aumento da lipofilicidade das estruturas. Este aumento pode acarretar efeitos no transporte e distribuição das moléculas pelos sistemas biológicos, efeitos alostéricos e de impedimento estérico ao nível do receptor e mesmo efeitos físico-químicos como formação de micelas ou diminuição de solubilidade que provocam a diminuição da resposta biológica destes compostos após ultrapassar-se certo valor de hidrofobicidade.

Para descrever matematicamente estas relações não-lineares de lipofilicidade, Hansch propôs o modelo parabólico o qual é utilizado até os dias atuais (Figura 25a).

Outro modelo aceito para descrever estas relações é o modelo bilinear proposto por Kubinyi (1977). Este modelo considera o transporte das substâncias nas diferentes fases do sistema biológico. Assim, segundo este modelo, com o aumento da lipofilicidade, a difusão do soluto torna-se etapa limitante do processo: um platô é alcançado quando o processo deixa de ser termodinâmico e passa a ser controlado cineticamente (Figura 25b).

Figura 25. Modelos não lineares: a) parabólico; b) bilinear.

Cada etapa de distribuição do fármaco pelo organismo e mesmo de interação do fármaco com seu receptor corresponde à partição deste entre fase aquosa e não aquosa esta última sendo membranas ou outras fases lipídicas como proteínas do soro, sítios ativos de enzimas, sítios de ligação de outras proteínas, entre outros.

Desta maneira, somente constantes de equilíbrio (valores de K_i e de IC_{50}) e de velocidade (valores de $\log K$) são valores de atividade biológica (AB) apropriados para os estudos de QSAR, o que significa que todo dado biológico tem que ser tratado de forma adequada para sua utilização em análises quantitativas.

Dados obtidos sob a forma de porcentagem devem ser convertidos para suas doses equivalentes em mol/L. Além disto, todos os valores, mesmo em mol/L, devem ser convertidos em sua forma logarítmica, sendo o $\log_{10}$ o padronizado. Logaritmos naturais podem ser utilizados em estudos de QSAR-3D como o CoMFA.

O uso da escala logarítmica acarreta a “normalização” dos dados, ou seja, a população de dados a ser analisada é transformada em uma população normal. Cumpre-se, desta maneira, condição necessária para aplicação do tratamento estatístico, em que se faz necessária a distribuição normal dos erros experimentais da determinação da variável dependente (AB) (Kubinyi, 1993).

Além disto, dentro desta escala, valores numéricos maiores são atribuídos aos compostos mais ativos da série.

2.4.2.4. Obtenção dos modelos de QSAR-2D

Os modelos de QSAR são obtidos com auxílio de computador. Programas especializados permitem não só as análises estatísticas de regressão linear, como também processos de validação. Alguns oferecem tratamentos estatísticos multivariados, como o *Partial Least Squares* (PLS) e análise de componentes principais (*Principal Components Analysis*, PCA).

A regressão linear correlaciona variáveis independentes X com variáveis dependentes Y através da aplicação do método dos mínimos quadrados. Já os tratamentos multivariados baseiam-se em análises discriminantes, separando os dados de acordo com diferentes propriedades (ex: compostos ativos e inativos) por considerar a combinação linear de outras características, como parâmetros físico-químicos.

No geral, a maioria dos programas oferece três tipos de modelos quantitativos: linear, parabólico e bilinear.

Estes programas auxiliam também na seleção de variáveis para se obter os melhores modelos, fornecendo matrizes de correlação cruzada (coeficientes de correlação entre as

variáveis) e sistemas de busca pelos métodos sistemáticos e pela aplicação do algoritmo genético.

A busca sistemática de variáveis aplica regressão linear no tratamento das variáveis. É simples e rápida, sendo a primeira a ser utilizada nos ensaios de QSAR.

Entretanto, quando a base de dados biológicos é pequena, e até mesmo mediana, quando comparada ao número de parâmetros fornecidos ou de características a serem consideradas no estudo, pode-se obter modelos não preditivos (fenômeno conhecido como “superajuste” ou *overfitting*), ou mesmo não se obter modelo algum.

O modelo superajustado pode representar as atividades das amostras utilizadas para construí-lo, mas não é capaz de realizar previsões sobre atividade de novas moléculas.

Com o objetivo de tornar a regressão linear adequada para estes casos, pode-se combiná-la à análise de componentes principais (PCA). Entretanto, esta análise assume a independência dos parâmetros utilizados, o que não corresponde à verdade para a maioria das aplicações práticas. Assim, as características selecionadas para o modelo a partir de busca sistemática, que utiliza-se da abordagem descrita, podem não ser as mais preditivas. Além disto, a redução do número de parâmetros é vital para evitar o fenômeno de *overfitting*.

O algoritmo genético, derivado da analogia com a evolução do DNA, permite a construção de modelos de alta qualidade e potencial de estimativa, além de disponibilizar informações adicionais não fornecidas pela aplicação das técnicas de regressão linear padrão, mesmo para grupos de dados com muitas características a serem consideradas.

Nesta analogia, indivíduos são representados como fitas unidimensionais de informação. Uma população inicial é criada a partir de informações randômicas. Para estimar a qualidade de um indivíduo utiliza-se uma função de ajuste, assim, os melhores indivíduos recebem melhores pontuações de ajuste. Estes possuem maior probabilidade de serem combinados com outros indivíduos, propagando seu “material genético” para sua prole por meio de processos de cruzamentos genéticos nos quais pedaços do material genético são retirados de cada “progenitor” e recombinados para criar um indivíduo “filho”. Após muitos cruzamentos, a média de ajuste dos indivíduos da população cresce como consequência do aperfeiçoamento genético da população.

O uso de algoritmo genético é útil na análise de dados, principalmente, na tarefa de reduzir o número de parâmetros dos modelos e de selecionar as melhores variáveis. Apresenta série de vantagens sobre as demais técnicas, sendo algumas delas:

- ✕ fornece múltiplos modelos enquanto as demais resultam em um único modelo;
- ✕ não despreza as variáveis que apresentam altos coeficientes de correlação cruzada e, sim, as combina para criar novas e melhores variáveis;

- ✗ incorpora medida de erro LOF (*lack of fit*), que descreve a falta de ajuste do modelo. Esta medida permite ao usuário suavizar o ajuste;
- ✗ permite o uso de grande número e variedade de parâmetros na construção de modelos.

Embora as equações lineares e parabólicas possam ser obtidas a partir da aplicação da maioria das planilhas de cálculos disponíveis no mercado, os programas especializados oferecem as ferramentas descritas anteriormente adaptadas às necessidades dos estudos de QSAR. Além disto, a obtenção de equações bilineares só pode ser feita com a utilização de *softwares* desenvolvidos para esta aplicação, como o caso do "Billin Program[®]", disponível para uso irrestrito da comunidade científica desde 1998 (Tavares, 2004).

2.6. SÍNTESE PARALELA

As metodologias de síntese paralela e combinatória foram originalmente desenvolvidas para atender à necessidade de rotas sintéticas para obtenção de peptídeos de forma rápida, confiável e eficaz em quantidades suficientes e com pureza adequada para suas aplicações (Atherton, Sheppard, 1989; Moos, 1997).

Entretanto, devido à capacidade de gerar diversidade molecular, esta abordagem foi rapidamente aplicada à síntese orgânica e, mais tarde, ao desenvolvimento de fármacos.

Utilizando-se a síntese orgânica clássica é possível gerar cerca de 25 a 50 compostos por ano, sendo este número ampliado cerca de 100 vezes ou mais aplicando-se a síntese paralela e cerca de 1000 vezes ou mais, se se utiliza a química combinatória (Chabala, 1998).

O conceito geral das sínteses paralela e combinatória é ilustrado na Figura 26.

Figura 26. Conceito geral da química combinatória.
(Adaptado de *Eur. J. Med. Chem.*, 1996, 31, 87-98)

Enquanto na química orgânica clássica, uma espécie reage com a outra para gerar, senão um único, ao menos um produto principal, na síntese paralela e na combinatória um grupo de análogos A ($A_1 \rightarrow A_n$) é misturado a um grupo de reagentes B ($B_1 \rightarrow B_n$) para que se obtenha todas as possíveis combinações (A_i-B_j). As diferentes combinações de reagentes similares levam ao aumento considerável de compostos sintetizados (Williard *et al.*, 1996).

Segundo Chabala (1998), a química combinatória difere fundamentalmente da síntese paralela, uma vez que na primeira as múltiplas combinações são realizadas em um único recipiente, criando, assim, misturas de compostos. Estas misturas são analisadas quanto à atividade biológica e aquelas que apresentam atividade promissora são posteriormente separadas para que se identifique(m) o(s) análogo(s) ativo(s).

Diferentes estratégias combinatórias podem ser aplicadas para se obter grandes bibliotecas de diferentes compostos, que podem ser avaliados frente a critérios pré-selecionados, como por exemplo potência ou atividade biológica. Dentre as mais utilizadas podem-se citar o "split-mix", "tea-bag", "multipin", "one bead-one compound" (Moss, 1997; Seligmann, Lebl, Lam, 1998).

A elucidação estrutural das misturas ativas também envolve diferentes estratégias, como a desconvolução, a triagem de posição, a triagem ortogonal, entre outras.

Já a síntese paralela gera um único composto por recipiente reacional, não sendo, portanto, necessárias as etapas de separação. Esta abordagem leva à produção de bibliotecas menores, mas, como permite a identificação direta da atividade biológica dos compostos obtidos, é ideal para a aplicação conjunta com análises de relação estrutura química-atividade biológica (QSAR) (Chabala, 1998).

A seleção da estratégia a ser utilizada, paralela ou combinatória, depende do objetivo da preparação da biblioteca, ou seja, se se pretende descobrir um novo protótipo ou otimizar um pré-existente. Bibliotecas maiores obtidas por meio de química combinatória permitem seleção de novos protótipos, enquanto bibliotecas menores, direcionadas para otimização estrutural de protótipo pré-existente, são obtidas através da síntese paralela.

Tanto para a síntese paralela quanto para a combinatória devem ser consideradas as seguintes etapas de planejamento:

- ✗ Escolha da biblioteca;
- ✗ Escolha do tipo de reação: fase sólida, líquida ou em solução;
- ✗ Seleção de reagentes, resinas, ligantes e solventes;
- ✗ Testes preliminares para validação da rota sintética e das condições propostas;
- ✗ Síntese da biblioteca;
- ✗ Avaliação biológica;
- ✗ Identificação do(s) composto(s) ativo(s);
- ✗ Confirmação da atividade biológica;
- ✗ Interpretação dos resultados.

Nas reações em fase sólida os reagentes são acoplados a resina sólida e insolúvel diretamente ou por meio de ligantes sendo, ao final das reações, o produto clivado da mesma.

A síntese em fase sólida apresenta como principal vantagem a simplicidade de purificação dos produtos obtidos, geralmente por filtração, seguida de sucessivas lavagens do suporte sólido com diferentes solventes. Por essa razão, diversas metodologias classicamente empregadas em síntese orgânica puderam ser adaptadas à síntese em fase sólida, resultando na automação de processos. Como principais desvantagens encontra-se a necessidade de uso de excesso de reagente a fim de assegurar a completa conversão do substrato, visto que a difusão dos reagentes pela matriz polimérica, a escassez de métodos analíticos para o monitoramento das reações e a necessidade de se adaptar as metodologias sintéticas já conhecidas para a utilização em fase sólida são fatores limitantes (Balkenhohl *et al.*, 1996; Thompson, Ellman, 1996).

A figura 28 ilustra o processo de síntese em fase sólida.

Figura 27. Etapas de planejamento de bibliotecas.

Figura 28. Síntese em fase sólida.
(Adaptado de <http://www.cienciahoj.org/hoy40/quim3.htm>)

As reações em solução têm como principal vantagem utilizar as mesmas condições de reação empregadas na síntese orgânica clássica, sem a necessidade de emprego dos excessos de reagentes, como na síntese em fase sólida. A principal desvantagem desta metodologia, em alguns casos, está na complexidade de purificação dos produtos (Gayo, 1998). A Figura 29 mostra o equipamento manual para essa síntese.

Devido à falta de métodos simples e eficientes para a purificação dos produtos obtidos, a síntese em solução ficou, inicialmente, restrita à seqüências de reação curtas (Gayo, 1998).

Atualmente, entretanto, esta limitação foi contornada por meio da utilização de reagentes e catalisadores imobilizados em suportes sólidos ou de resinas poliméricas para a remoção de excessos de reagentes e/ou sub-produtos. Estas resinas são conhecidas como "scavengers" (Eames, Watkinson, 2001).

O uso de suportes sólidos solúveis, em geral, polímeros, é conhecido como síntese em fase líquida. Dentre os polímeros utilizados, o mais empregado para imobilização de substratos é o polietilenoglicol devido à sua alta solubilidade em ampla variedade de solventes orgânicos (Gravert, Janda, 1997). A utilização destes suportes solúveis permite que a reação seja realizada de forma homogênea, sem necessidade de adaptação experimental. Estes

Figura 29. Síntese em solução.

suportes são separados do meio reacional por precipitação seletiva, filtrados e secos para serem utilizados na etapa subsequente da rota sintética.

A síntese em fase líquida associa vantagens da síntese em fase sólida, como a simplicidade na purificação dos produtos, com vantagens da síntese em solução, dispensando a necessidade de adaptação de metodologias sintéticas. Além disto, os polímeros solúveis custam entre 10 e 500 vezes menos que as resinas poliméricas comercialmente disponíveis para síntese em fase sólida (Molteni *et al.* 1998).

A integração destas novas tecnologias sintéticas a metodologias racionais de desenvolvimento de fármacos, como o QSAR-2D, 3D e 4D, leva a aumento sinérgico da eficácia destas estratégias (Linusson *et al.*, 2001).

Os estudos de QSAR fornecem as diretrizes para o planejamento e otimização de novos compostos, enquanto que as abordagens sintéticas, muitas vezes baseadas em metodologias automatizadas, fornecem novas classes de protótipos, além de gerar, rapidamente, informações de relação estrutura química-atividade biológica.

2.7. COMPOSTOS NITRO-HETEROCÍCLICOS

Os nitroaromáticos são compostos com atividade bacteriostática e bactericida. Em particular, os nitrofuranos e derivados são muito usados em infecções urinárias e enterites (Korolkovas, 1988).

Os primeiros compostos nitro-heterocíclicos introduzidos na terapêutica foram os nitrofuranos (Dupouy-Camet, 2004).

Sua atividade biológica é principalmente atribuída à redução do grupo nitro por nitro-redutases presentes nos microrganismos e conseqüente geração de radicais livres. Estas espécies altamente reativas são capazes de danificar DNA, RNA e outras macromoléculas e componentes celulares importantes, inutilizando-os, além de propagar seus efeitos deletérios (Hardman, Gilman, Limbird, 1996; Race *et al.*, 2005; Pozas, *et al.*, 2005).

São fármacos ativos contra ampla variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em concentrações que variam de 0,1 a 30 µg/mL, mas são ineficazes contra *Proteus* e *Pseudomonas* (Günay *et al.* 1999.)

Tais compostos podem provocar série de efeitos colaterais, quando administrados em elevadas concentrações. Entre as mais comuns estão as reações de hipersensibilidade, pneumonite, urticária, hepatotoxicidade, angiodema e reações como mal-estar, cefaléia e tonturas características de neurotoxicidade (Hardman, Gilman, Limbird, 1996).

A figura 30 mostra estruturas de derivados nitrofurânicos utilizados na terapêutica.

Figura 30. Exemplos de derivados nitrofurânicos.

A atividade antiprotozoária de derivados 5-nitrotiofenos é bem estabelecida. Em 1981, Gayral demonstrou que os derivados 5-nitrotiofênicos apresentam maior atividade contra protozoários do que os derivados nitrofurânicos (Gayral *et al.*, 1981). Recentemente, o grupo liderado por Maldonado comprovou significativa atividade antiparasitária de compostos derivados de hidrazonas (Tedlaouti *et al.*, 1990), aldiminas (Tedlaouti *et al.*, 1991) e éter de oximas (Delmas *et al.*, 1993) em séries de nitrotiofenos.

Estudos de relação estrutura química-atividade biológica evidenciaram que o aumento da conjugação na estrutura molecular dos derivados tiofênicos acarreta aumento na atividade antiparasitária dos compostos (Vanelle *et al.*, 1994). Também foram realizados estudos de QSAR elucidando a capacidade genotóxica destes derivados (Debnath, Hansch, 1993).

Entre os parasitas para os quais os nitrotiofenos apresentam atividade estão *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Leishmania tropica* e *Leishmania infantum* (Vanelle *et al.*, 1994).

Compostos nitroderivados parecem se constituir em boa alternativa de protótipo não só para o desenvolvimento de novas moléculas ativas contra endemias tropicais, mas também para tratamento da tuberculose. Em trabalho de mestrado, averiguamos que compostos 5-nitro-2-tiofilidênicos benzidrazídicos apresentam atividade promissora frente ao *Mycobacterium tuberculosis* (R_a e R_v) (Rando *et al.*, 2002). Também foram promissores quando testados contra outras espécies de micobactérias como o *M. avium* e o *M. maomoeses*.

Assim, tais derivados constituem-se em bons protótipos para serem explorados na procura de novos fármacos contra doenças para as quais a necessidade de novas moléculas ativas é urgente, caso das endemias tropicais e da tuberculose.

III. OBJETIVOS

À vista do exposto e ante à necessidade de se obter alternativas quimioterápicas contra as endemias tropicais e a tuberculose, doenças de importância médico-social incontestes ao País, os objetivos deste trabalho foram:

3.1 Aplicar metodologia de Topliss para derivados monossustituídos com vistas à otimização do protótipo dessa classe de compostos;

3.2 Obter derivados 5-nitro-2-heterocíclicos benzidrazídicos mono e dissustituídos com atividade potencial em endemias tropicais – doença de Chagas, malária, leishmaniose – e na tuberculose;

3.3 Estender os estudos de Topliss para a abordagem clássica – Hansch-Free-Wilson – de correlações quantitativas entre as estruturas químicas e as atividades biológicas mencionadas;

3.4 Obter subsídios para o planejamento de candidatos a fármacos contra essas endemias.

Merece realce o fato de que os derivados nitro-heterocíclicos furânicos e tiofênicos foram escolhidos como protótipos por se tratarem de compostos de amplo espectro de ação quimioterápica, apesar da toxicidade. Trabalhos anteriores em nosso laboratório mostraram o caráter promissor de derivados nitro-heterocíclicos análogos, sendo os nitrotiofênicos mais ativos que os nitrofurânicos. Dessa forma, a procura por modelos quantitativos com o emprego de variáveis indicadoras poderia mostrar o grau de influência dos anéis nitro-heterocíclicos na atividade biológica.

Espera-se, nesse particular, que, por meio do planejamento adequado, com base em descritores físico-químicos, se possa aumentar o índice quimioterápico dessas substâncias, graças ao aumento significativo de sua eficácia biológica.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Reagentes

- × ácido acético (Merck);
- × ácido clorídrico (Merck);
- × ácido 3-dimetilaminobenzóico (Aldrich);
- × ácido 4-aminobenzóico (BDH Limited);
- × ácido 4-clorobenzóico (Aldrich);
- × ácido 4-dimetilaminobenzóico (Aldrich);
- × ácido 4-hidroxibenzóico (Aldrich);
- × ácido 4-metoxibenzóico (Aldrich);
- × ácido 3,4-diclorobenzóico (Aldrich);
- × ácido 3,4-difluorobenzóico (Aldrich);
- × ácido 3,4-dimetilbenzóico (Aldrich);
- × ácido 3,4-diaminobenzóico (Aldrich);
- × ácido 3-cloro-4-fluorobenzóico (Aldrich);
- × ácido 3-metóxi-4-nitrobenzóico (Aldrich);
- × ácido 3-hidroxi-4-nitrobenzóico (Aldrich);
- × ácido 3-amino-4-metoxibenzóico (Aldrich);
- × ácido 3-amino-4-hidroxibenzóico (Aldrich);
- × ácido 3-nitro-4-clorobenzóico (Aldrich);
- × ácido 3-amino-4-metilbenzóico (Aldrich);
- × ácido 3-hidroxi-4-metilbenzóico (Aldrich);
- × ácido 3-metóxi-4-metilbenzóico (Aldrich);
- × ácido 3-metil-4-aminobenzóico (Aldrich);
- × ácido 3-sulfonamida-4-clorobenzóico (Aldrich);
- × Alamar Blue®
- × amicacina (Sigma);
- × anfotericina B (Sigma);
- × artemisinina (Walter Reed Army Institute of Research);
- × azul de tetrazólio – NBT (Sigma)
- × canamicina (Sigma)
- × cloroquina (Sigma)

- × 3-clorobenzoato de metila (Aldrich);
- × 3-aminobenzoato de metila (Aldrich);
- × 3-metilbenzoato de metila ou 3-toluato de metila (Aldrich);
- × 3-trifluormetilbenzoato de metila (Aldrich);
- × 3-nitrobenzoato de metila (Aldrich);
- × 4-metoxibenzoato de metila (Aldrich);
- × 4-dimetilaminobenzoato de etila (Aldrich);
- × 4-clorobenzidrazida (Aldrich);
- × hidrazida do ácido benzóico (Aldrich);
- × hidrazida do ácido 4-clorobenzóico (Aldrich);
- × hidrazida do ácido 4-aminobenzóico (Aldrich);
- × hidrazida do ácido 4-hidroxibenzóico (Aldrich);
- × hidrazida do ácido 4-metilbenzóico (Aldrich);
- × hidrazida do ácido 4-trifluormetilbenzóico (Aldrich);
- × hidrazida do ácido 4-nitrobenzóico (Aldrich);
- × hidrazida do ácido 3-hidroxibenzóico (Aldrich);
- × hidrazida do ácido 3-metoxibenzóico (Aldrich);
- × hidrato de hidrazina 35% (Aldrich);
- × hidrazina 90% (Aldrich);
- × hidrazina monoidratada (Aldrich);
- × solução 1 M de hidrazina em THF (Aldrich);
- × 5-nitro-2-furaldeído (Aldrich);
- × 5-nitro-2-tiofeno carboxaldeído (Aldrich);
- × hidróxido de sódio (Merck);
- × pentóxido de fósforo (CARQ – Cromato/ Aldrich);
- × polietersultona – PES (Sigma)
- × reagente de Malstat[®] (Flow Inc.)
- × Tampão HEPES
- × Tween 80

4.1.2. Solventes

- × acetona (Merck);
- × dimetilsulfóxido (Synth);
- × etanol (Merck);
- × metanol (Merck);

- × *N,N*-dimetilformamida (DMF) (Nuclerar CAQ – Casa da Química);
- × *N,N*-dimetilformamida (DMF) grau HPLC (Aldrich);
- × tetraidrofurano (THF) (Aldrich).

4.1.3. Solventes deuterados

- × clorofórmio deuterado (CDCl_3) (Aldrich)
- × dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) (Aldrich)
- × padrão interno – tetrametilsilano (TMS) (Sigma)

4.1.4. Parasitas, células e vetores

- × Eritrócitos humanos tipo A - Interstate Blood Bank, Memphis, TN
- × *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v (ATCC 27294) – American Type Culture Collection
- × *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v -pFPCA1
- × *Plasmodium falciparum* cepa D₆ Serra Leoa - Walter Reed Army Institute of Research, USA
- × *Plasmodium falciparum* cepa W₂ Indochina - Walter Reed Army Institute of Research, USA
- × Vetor pMV261 – gentilmente cedido por Raphael Valvidia, University of Stanford, USA

4.1.5. Meios de Cultura

- × Caldo Luria-Bertani
- × Caldo 7H12
- × Caldo 7H9GC
- × Caldo Middlebrook 7Hp
- × Meio RPMI 1640
- × Soro fetal bovino 10% - Gibco Chem. Co.
- × Soro sanguíneo humano tipo A-Interstate Blood Bank, Memphis, TN

4.1.6. Equipamentos

- × Fluorímetro Cytofluor II® para microplacas - PerSeptive Biosystems
- × Leitor de placa Fluostar Galaxy® - BMG LabTechnologies
- × Leitor de placa EL-340 Biokinetics Reader® - Bio-Tek Instruments

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Síntese dos nitroderivados (Tavares, 1993; Tavares *et al.*, 1999)

Os nitroderivados obtidos na Parte I desse trabalho, ou seja, empregando-se a metodologia de Topliss, foram sintetizados de acordo com a rota sintética apresentada à Figura 32, sendo R2 = H (Rando *et al.*, 2001).

Na Parte II, para aplicação da síntese paralela e obtenção de número grande de compostos em curto período de tempo, se faz necessária a utilização de rota sintética simples e rápida (Figura 31).

Figura 31. Rota sintética para os derivados benzidrazídicos.

Para os compostos cujas hidrazidas são comercialmente disponíveis apenas a etapa (3) do processo foi realizada. Para os demais análogos, sintetizaram-se as hidrazidas por meio de esterificação do respectivo ácido benzóico (1) seguida da reação com hidrazina em meio aquoso (2).

4.2.1.1. Etapa 1: Esterificação

A partir do ácido benzóico ou de seus derivados substituídos no anel aromático (30 mmol) obteve-se o éster metílico por refluxo, com excesso de metanol (60 mmol) e ácido sulfúrico (0,06 mL), em vaso reacional acoplado à placa de refluxo, por quatro horas. Após este período, destilou-se o excesso de metanol, obtendo-se o sólido, que foi filtrado em funil

de Büchner, sob pressão reduzida, e, em seguida, lavado com pequenas porções de água destilada gelada, secado em bomba de alto vácuo e armazenado em dessecador contendo sílica-gel e pentóxido de fósforo.

Para os ésteres contendo grupos amínicos ou derivados como substituintes, o isolamento foi realizado por meio da adição de solução de NaOH 10% (p/V) ao meio reacional até pH 7, aproximadamente, quando ocorre a precipitação do composto em meio aquoso sob a forma de cristais amorfos. Estes cristais são separados por meio de filtração e seguem o mesmo tratamento dos demais produtos obtidos.

4.2.1.2. *Etapas 2: Preparação de hidrazidas*

As hidrazidas foram obtidas da reação de hidrato de hidrazina 35% (p/V) ou 65% (p/V) (11 mmol) aquecida a 60 °C, em vasos reacionais adaptados à placa de refluxo e termômetro. Sob agitação magnética, adicionou-se, lentamente, o éster do análogo benzóico mono ou dissustituído (0,5 mmol). Elevou-se, então, a temperatura até o refluxo, mantendo-o por aproximadamente 1 hora. Resfriaram-se as soluções em banho de gelo, separaram-se os sólidos formados por filtração sob pressão reduzida. Os produtos obtidos foram secados em bomba de vácuo, armazenando-os em dessecador contendo sílica-gel e pentóxido de fósforo.

4.2.1.3. *Etapas 3: Obtenção dos produtos finais*

Em vasos reacionais de 10 mL, adicionou-se o nitroaldeído desejado (10 mmol) à mistura de água destilada e etanol, na proporção de 2:5. A mistura foi aquecida até o refluxo, quando, então, se adicionou, sob agitação e lentamente, as benzidrazidas substituídas correspondentes, em proporção equimolar (10 mmol). Observou-se a formação de precipitados, os quais foram filtrados sob pressão reduzida e secados em bomba de vácuo, sendo armazenados em dessecador com sílica-gel e pentóxido de fósforo.

Todas as etapas foram realizadas em solução, sem necessidade de acoplamento de reagentes em resinas ou mesmo a utilização de ligantes ou agentes seqüestrantes, o que barateia e facilita o processo.

A biblioteca foi construída utilizando-se dois modelos de sintetizadores paralelos automáticos, ambos da Argonaut Technologies (Figura 32).

First Mate Benchtop Synthesizer

Argonaut Quest 210 Parallel
Organic Synthesizer

Figura 32. Sintetizadores paralelos automáticos utilizados.

As etapas **(1)** e **(2)** da figura 32 foram realizadas em sintetizador paralelo “*First Mate Benchtop Synthesizer*”, o qual possibilita até 16 reações simultâneas e em volumes maiores, necessários neste caso, por se tratar de síntese de materiais de partida. Já a etapa de obtenção dos produtos finais **(3)** foi realizada utilizando-se sintetizador paralelo “*Argonaut Quest 210 Parallel Organic Synthesizer*”. Embora este equipamento seja mais apropriado para sínteses em fase sólida ou em solução utilizando-se resinas solúveis, sua utilização justificou-se por possuir capacidade para 20 reações simultâneas. Além disto, este equipamento possui sistema de liberação automática de solvente, a qual facilitou a etapa de isolamento dos compostos finais.

Estes são obtidos como precipitados e isolados pela solubilização em DMF, seguida de reprecipitação por adição de água a esta solução. O produto reprecipitado foi filtrado e secado em dessecador com pentóxido de fósforo.

A solubilização em DMF se fez necessária para a retirada dos compostos dos recipientes reacionais.

4.2.2. Análise estrutural dos compostos obtidos

Na parte 1 do trabalho, os compostos sintetizados segundo a metodologia de Topliss foram analisados a partir das seguintes técnicas e aparelhos:

- × ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono – Brucker DPX 300 MHz,
- × espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV) - FTIR Bomem,
- × cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) - HP 5890(2) e Shimadzu-LC10A,

- × ponto de fusão – Büchi
- × espectroscopia de massas – Shimadzu GCMS-QP 5050^A,
- × análise elementar - Perkin-Elmer 24013-CHN.

Estes equipamentos estão disponíveis no Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, SP, e na Central Analítica do Instituto de Química da USP, SP.

Para a análise estrutural dos compostos da biblioteca utilizaram-se as seguintes técnicas e aparelhos:

- × ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN) – Brucker 400 MHz Avance Systems,
- × espectroscopia de massas – Waters Alliance LC/MS Systems
- × análise elementar – Perkin-Elmer CHN/SO Series II Analyzer
- × cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – HPLC Alliance, Waters

Todos os equipamentos encontravam-se disponíveis no Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, University of Mississippi, Oxford, MS, Estados Unidos.

A elucidação da estrutura foi baseada, principalmente, nos espectros de RMN e nas espectroscopias de massas. Todos os compostos foram obtidos ou purificados para valores de pureza iguais ou maiores a 97%. Os espectros e respectivas atribuições, bem como outras análises, encontram-se no Apêndice A deste texto.

4.2.3. Métodos de Purificação

4.2.3.1. *Solventes*

Os solventes utilizados foram purificados segundo procedimentos descritos na literatura (Perrin, Armarego, Perrin, 1980).

4.2.3.2. *Produtos Finais e intermediários sintéticos*

Os produtos finais e intermediários sintéticos obtidos como misturas com seus materiais de partida foram purificados por cromatografia líquida em coluna ou mesmo por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE prep). As fases móveis utilizadas

foram acetato de etila/hexano com as proporções variando segundo as características de cada composto a ser purificado.

4.2.4. Determinação de coeficientes de partição (Klein *et al.*, 1998, Mirrlees, 1976, Pires, 1998)

Os ensaios de determinação de log P experimentais foram realizados no Laboratório de QSAR/QSAR-3D do Instituto de Química da Universidade de São Paulo sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Antônia Tavares do Amaral.

A determinação dos coeficientes de partição dos derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos benzidrazídicos, obtidos para o estudo de Topliss, foi realizada de forma análoga ao descrito por Mirrlees *et al.* e seguindo as diretrizes indicadas por Klein *et al.*

4.2.4.1. *Preparo e estabilização da coluna cromatográfica*

4.2.4.1.1. Coluna cromatográfica

Utilizou-se coluna ODS-Supelcosil 5 µm com 20 mm de comprimento.

4.2.4.1.2. Saturação da fase estacionária com n-octanol

O sistema cromatográfico é constituído de reservatório do eluente - bomba de fluxo - injetor - coluna - detector. Uma vez instalado este sistema, impôs-se fluxo de 0,250 mL/min. A conexão entre a coluna e o detector foi desfeita, evitando-se que o eluente produzisse leitura e, então, injetaram-se alíquotas de 20 µL de *n*-octanol, grau HPLC, com intervalos de 5 minutos entre uma alíquota e outra, até que se observasse a saída de *n*-octanol da coluna. O detector é mantido desconectado em todo este período.

4.2.4.1.3. Estabilização da coluna

Após a reconecção do detector mantiveram-se os sistemas nestas condições por cerca de doze horas, conservando a temperatura da sala constante e ajustada para 23 ± 1 °C. Após este período, a linha base do cromatograma obtido deve ser estável ou, em outras palavras, o sinal do detector deve ser constante.

4.2.4.2. Padronização do sistema de partição

Uma vez estabilizado o sistema, registraram-se os cromatogramas. Inicialmente, injetou-se a tiouréia, que não deve ficar retida na coluna devido a suas propriedades polares, a fim de se determinar o volume morto (V_0). A tiouréia é injetada em solução de tampão Tris-HCl (pH 7,4, força iônica=0,10 M, KCl).

A seguir, determinaram-se as constantes de capacidade k' para as substâncias padrão de coeficientes de partição conhecidos, sob fluxo de 1 mL/min (Tabela VIII), por meio da equação:

$$k' = (V_r - V_0) / V_0$$

em que,

V_r = volume de eluente necessário para eluir o composto

V_0 = volume morto.

A curva de calibração correspondente encontra-se à Figura 33.

Tabela VIII. Padrões e Log P conhecidos

Curva de Calibração				
Padrões	TR (min) (a)	k' (b)	log K'	log P(d)
Tiouréia	0,889 (c)			
Benzamida	2,326	1,615	0,21	0,64
Acetanilida	5,508	5,191	0,72	1,00
Acetofenona	14,015	14,753	1,17	1,58
Nitrobenzeno	23,084	24,947	1,40	1,85
<i>p</i> -clorobenzeno	87,213	97,029	1,99	2,40
Clorobenzeno	227,916	255,181	2,41	2,80

(a) Cada valor é o resultado de média de, no mínimo, 3 medidas.

(c) T_0 = Tempo morto

(b) Capacity factor; $k' = (TR - T_0)/T_0$

(d) Valores da literatura²⁶

Figura 33. Curva de calibração da determinação de coeficiente de partição por HPLC.

4.2.4.3. Determinação dos valores de coeficiente de partição, $\log P_{HPLC}$

As amostras foram solubilizadas em mistura de tampão Tris-HCl e dimetilsulfóxido. Foram injetadas sob fluxo de 0,250 mL/min e detectadas num comprimento de onda de 400 nm, por meio de detector *diodoarray*.

A partir dos tempos de retenção obtidos para os compostos em seus cromatogramas, obtiveram-se os valores de k' para cada composto analisado. Estes valores foram, então, extrapolados para a curva de calibração para os compostos padrão, obtendo-se, assim, os valores de $\log P$ correspondentes. Estes foram resultantes da média de duas três determinações. O resumo da metodologia de determinação de coeficiente de partição por meio de HPLC é apresentado na Figura 34.

Figura 34. Determinação de $\log P$ por HPLC.

4.2.5. Ensaio Biológicos

4.2.5.1. Leishmaniose

Os ensaios para atividade contra *L. donovani* foram realizados pelo grupo de pesquisa sob orientação do Dr. Babu Lal Tekwani, no centro de pesquisa de produtos naturais, National Center for Natural Product Research, University of Mississippi, USA.

4.2.5.1.1. Parasitos utilizados

Os compostos foram testados *in vitro* contra cultura de promastigotas de *Leishmania donovani* crescidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e incubadas a 26 °C, por três dias. Após este período, a cultura foi diluída para 5×10^5 promastigotas/mL.

4.2.5.1.2. Metodologia

As amostras foram testadas na faixa de concentração de 10 µg/mL a 0,01 µg/mL. Os compostos foram solubilizados diretamente na suspensão celular e dispostos em placas de 96 orifícios, que foram incubadas a 26 °C por 48 horas.

O crescimento das promastigotas foi determinado pelo uso do corante vital Alamar Blue® (Mikus, Steverding, 2000). Mediu-se a fluorescência padrão em leitor de placas Fluostar Galaxy® em comprimentos de onda (λ) de excitação de 544 nm e de emissão de 590 nm.

A porcentagem de crescimento da cultura em presença dos compostos foi calculada e plotada *versus* a concentração para se obter os valores de IC₅₀ e IC₉₀ dos compostos. Utilizaram-se pentamidina e anfotericina B como padrões.

As amostras que exibiram atividade acima da faixa testada foram reanalisadas em concentrações maiores que as utilizadas neste primeiro ensaio.

4.2.5.2. Malária

Os ensaios de malária foram realizados pelo grupo de pesquisa dirigido pela Dra. Shabana Khan, do centro de pesquisa de produtos naturais, National Center for Natural Product Research, University of Mississippi, USA.

4.2.5.2.1. Cepas de Plasmodium falciparum

Os ensaios de atividade antimalárica dos compostos foram realizados contra duas cepas de *P. falciparum* adquiridas da Divisão Terapêutica Experimental do Walter Reed Army Institute of Research, Washignton DC, USA. São estas:

- × D₆ Serra Leoa – cepa sensível à cloroquina e
- × W₂ Indochina – cepa resistente à cloroquina.

P. falciparum foi crescido em mistura de meios RPMI 1640 e RBCs tipo A humano suplementados com soro tipo A humano a 10 % e com 25 mM de tampão HEPES, 27 mM de bicarbonato e 60 µg/mL de amicacina em frascos de cultura de tecido.

As duas cepas foram supridas diariamente com meio fresco, células sangüíneas e gaseificadas com mistura de 90% de N₂, 5% de O₂ e 5% de CO₂ e incubadas a 37 °C.

4.2.5.2.2. Metodologia

Os compostos foram dissolvidos em DMSO (2 mg/mL) e testados a três concentrações diferentes (4760; 1586,6 e 528,8 ng/mL). As atividades biológicas foram obtidas de curvas dose-resposta como valores de IC₅₀. As amostras foram ensaiadas em triplicatas.

Compostos que apresentaram valores de IC₅₀ menores que a menor concentração testada (528,9 ng/mL) foram retestados em faixa de concentrações menores.

O ensaio de atividade antimalárica baseou-se na determinação da atividade de lactato desidrogenase (LDH) do plasmódio (Makler, Hinrichs, 1993).

Suspensão de eritrócitos infectados (parasitemia de 2% e hematócrito de 2%) foi preparada usando eritrócitos humanos tipo A em meio RPMI 1640 suplementado com soro humano 10% e 60 mg/mL de amicacina .

Adicionou-se à placa de 96 orifícios, 200 µL de suspensão de eritrócitos e 10 µL das amostras diluídas em meio de cultura, em poços paralelos. Incubou-se a placa a 37 °C por 72 horas em estufa modular, purgada com mistura de gás de 90% de N₂, 5% de O₂ e 5% de CO₂. Após este período, cada poço contendo as amostras foi misturado com as amostras de seu respectivo poço paralelo contendo os eritrócitos e 20 µL de cada mistura foram transferidos para um terceiro poço em nova placa contendo 100 µL de reagente Malstat®. Incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos. Adicionaram-se 20 µL de mistura de NBT/PES 1:1 e reincubou-se ao abrigo da luz por 1 hora.

A reação foi parada pela adição de 100 µL de solução de ácido acético a 5% em cada poço. A placa foi lida a 650 nm usando leitões EL-340 Biokinetics®.

Os dados foram exportados para o Excel e a planilha construída para gerar curvas de dose-resposta. Artemisinina e cloroquina foram incluídas como fármacos controle. DMSO foi utilizado como controle do veículo.

4.2.5.3. Tuberculose

Os ensaios biológicos contra micobactérias foram realizados por meio de diferentes técnicas, visto que estes ensaios foram utilizados tanto na aplicação da metodologia de Topliss quanto para a biblioteca sintetizada para os estudos de QSAR-2D.

Os primeiros compostos sintetizados foram analisados no Brasil, pela Prof^a. Dr^a. Dayse Sato Nakamura, do Instituto Adolfo Lutz, Ribeirão Preto, por meio da técnica de microdiluição em placas.

A segunda série de análises, para os compostos da biblioteca sintetizada, foi realizada pelo grupo de pesquisa do Institute for Tuberculosis Research, University of Illinois at Chicago, Chicago, USA, coordenado pelo Prof. Dr. Scott Franzblau.

4.2.5.3.1. Microdiluição em placas (Franzblau, 1998; Nakamura, 1998)

➤ Cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), tanto pelo método da macrodiluição em tubos quanto pelo método de microdiluição em placas, foi utilizada a cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Ra, H37Rv, além de outras micobactérias como *M. malmoeense*, *M. avium*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*.

➤ Metodologia

A determinação da CIM em microplaca utilizando Alamar Blue® como revelador frente a cepa padrão de *M. tuberculosis* foi realizada segundo a técnica proposta por Franzblau *et al* (1998).

Em microplaca estéril de 96 orifícios, depositaram-se 200 µL de água destilada estéril em todos os orifícios periféricos, a fim de se evitar a evaporação durante a incubação na estufa.

Prepararam-se soluções dos fármacos em meio de cultura de concentrações finais de 400 µg/mL.

Representação esquemática das microplacas é como segue. Nestas placas, cada linha foi utilizada para o teste de um derivado diferente (Figura 35).

Figura 35. Microplaca para determinação da CIM.
Adaptado de Nakamura, 1998.

Os orifícios da linha B da coluna 3 até a coluna 9 receberam 100 µL de meio de cultura. No orifício da coluna 3 adicionaram-se 100 µL do fármaco (400 µg/mL) para se obter concentração final de 100 µg/mL do fármaco.

Os demais orifícios foram preenchidos de forma a se obter diluição seriada, utilizando-se alíquotas de 100 µL para se alcançar concentrações de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL e 3,125 µg/mL.

Nas colunas 2, 10 e 11 foram preparados os controles do fármaco, controle positivo e controle do meio, respectivamente.

O controle do fármaco foi preparado pela adição de 10 µL da solução do fármaco a 100 µL de meio de cultura. Já os orifícios do controle positivo receberam 100 µL de meio de cultura e 100 µL de suspensão bacteriana e os orifícios de controle de meio foram preenchidos apenas com 200 µL de meio de cultura.

Adicionaram-se alíquotas de 100 µL de suspensão bacteriana em todos os orifícios teste, exceto nos orifícios de controle do meio e do fármaco. A suspensão bacteriana utilizada foi preparada pelo ajuste de sua turbidez pela escala McFarland nº1 e posteriormente diluída a 1:25 em meio de cultura 7H₉.

Homogeneizaram-se todos os orifícios para, em seguida, selar as placas com Parafilm® e incubá-las a 37 °C. Após cinco dias de incubação, adicionaram-se 25 µL de mistura recentemente preparada na proporção de 1:1 de Alamar Blue® e solução de Tween 80® a 10% a um dos orifícios da coluna 10 (positivo). As placas foram reincubadas a 37 °C, por 24 horas. Caso a preparação contida neste orifício se torne rósea, a mistura de Alamar Blue® e Tween 80® é adicionada aos demais orifícios e novamente incubada por 24 horas a 37 °C.

A manutenção da cor azul nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de coloração rósea, como presença de crescimento bacteriano.

A CIM é, então, definida como a menor concentração do fármaco capaz de impedir a mudança de cor azul para rósea.

4.2.5.3.2. Green Fluorescent Protein Microplate Assay

A técnica conhecida com “Green Fluorescent Protein Microplate Assay” (GFPMA) foi desenvolvida para varredura rápida e eficiente de grande número de amostras (Changsen, Franzblau, Palittapongarnpim, 2003).

Esta técnica combina o uso de microplacas, expressão gênica de proteínas fluorescentes e, também, a facilidade de monitoramento de fluorescência (Collins, Torrero, Franzblau, 1998).

❖ Cepas de Mycobacterium tuberculosis

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada a cepa padrão de *M. tuberculosis* H₃₇R_v modificada geneticamente para se obter a cepa H₃₇R_v-pFPCA1. Esta cepa é obtida pela incorporação do vetor pFPV₂, que contém gene responsável pela expressão de variante da proteína GFP de alta intensidade de fluorescência.

❖ Metodologia

A determinação da CIM das amostras foi realizada em microplacas pretas, de 96 orifícios, de forma a minimizar fluorescência de fundo. As fileiras mais externas foram preenchidas com água destilada estéril para prevenir a desidratação dos poços experimentais durante a incubação na estufa.

As amostras foram primeiramente diluídas em DMSO ou água destilada e desionizada e, então, diluídas mais duas vezes em 0,1 mL de caldo 7H9GC (sem Tween 80®) diretamente nas microplacas, em triplicatas.

A *M. tuberculosis* H₃₇R_v(pFPCA1) foi descongelada, sonicada por 15 segundo e cultivada a 37 °C, sob agitação em 100 mL de caldo 7H9GC com Tween 80® e 30 µg/mL de canamicina até se alcançar a densidade óptica de 0,4 a 0,5 no comprimento de onda de 550 nm.

As culturas foram diluídas para 2×10^5 /mL em caldo 7H12 e adicionaram-se 100 μ L a 100 μ L da diluição seriada dos compostos. O volume final nos orifícios foi de 200 μ L. Os orifícios contendo somente as amostras foram utilizados para controle de possível fluorescência dos compostos. Outros controles consistiram em controle positivo (contendo somente a bactéria) e controle do meio (contendo somente o meio de cultura utilizado). Todos os controles foram preparados em triplicatas.

As placas foram incubadas a 37 °C, sob atmosfera enriquecida com 5% de CO₂ e alta umidade por 8 dias. A fluorescência foi medida diariamente durante este período em fluorímetro de microplaca Cytofluor II com comprimentos de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 510 nm.

A média das triplicatas do controle de meio foram usadas como valores de “branco” para subtração de todos os valores de leitura dos orifícios testes e dos controles positivos. Porcentagem de inibição foi definida como $1 - (\text{fluorescência do teste} / \text{média da fluorescência das triplicatas do controle positivo}) \times 100$ após o sétimo dia de incubação.

A menor concentração de efeito de inibição a 90% foi considerada a CIM.

4.2.5.4. Doença de Chagas

Os ensaios contra *T. cruzi* foram realizados em conjunto com o laboratório do Prof. Dr. Sérgio Albuquerque, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

Os testes foram realizados *in vitro* sob as formas tripomastigotas (sanguíneas), utilizando-se cepas Y de *T. cruzi*. Avaliou-se a porcentagem de lise parasitária e calculou-se a concentração inibitória 50% (IC₅₀) dos compostos. Os ensaios foram realizados utilizando-se sangue de camundongos albinos infectados, obtido por punção cardíaca no pico parasitêmico (7º dia da infecção – cepa Y). O sangue infectado foi diluído com sangue de camundongo sadio e soro bovino fetal, de forma a se obter concentração final de sangue a 70%, com aproximadamente 10^6 formas tripomastigotas/mL.

Soluções estoques dos derivados foram preparadas por dissolução em DMSO.

Em placas de microtitulação, contendo 96 poços, adicionaram-se alíquotas das soluções estoque ao sangue infectado de forma a se obter concentrações finais de 10, 100, 250, 500 e 1000 μ g/mL.

O material foi incubado a 4 °C por 24 horas, sob agitação constante. Após este período, mediu-se a atividade quantitativamente por meio de contagem de formas tripomastigotas segundo método descrito por Brener (1962) e por determinação da

porcentagem de lise parasitária, por meio de comparação com grupo controle sem tratamento (apenas sangue infectado).

Como fármaco padrão utilizou-se violeta genciana nas mesmas concentrações anteriormente mencionadas. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

Como controle do meio utilizou-se solução de DMSO a 1%.

4.2.6. Estudos de QSAR

Os estudos de QSAR foram realizados com auxílio dos seguintes programas estatísticos para os cálculos de análises de regressão lineares múltiplas ou não-lineares:

- × Billin Program[®]: desenvolvido por Dr. Hugo Kubinyi, utiliza-se de plataforma MS-DOS e está disponibilizado gratuitamente para uso da comunidade científica no endereço: <http://home.t-online.de/home/kubinyi>
- × BuildQSAR[®]: versão beta 1.0.0, desenvolvido por Daniel Barbosa de Oliveira e pelo Prof. Dr. Anderson Coser Gaudio, ambos do Instituto de Física da Universidade Federal do Espírito Santo, disponível gratuitamente na internet no endereço: http://tau.cce.ufes.br/dfis/anderson/html/buildqsar_ing.htm

V. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. PARTE 1: METODOLOGIA DE TOPLISS

Como resultado da primeira etapa do projeto, sintetizaram-se, por meio da aplicação da metodologia de Topliss, ou árvore de decisão de Topliss (1997), seis derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos, cujos substituintes foram indicados no decorrer das análises biológicas. Estes compostos foram ensaiados contra cepas de *M. tuberculosis*, além de outras espécies de micobactérias como *M. avium* e *M. maomoeses*. Os resultados foram publicados por Rando *et al.* (2002).

Houve a necessidade de adaptação da técnica de determinação da atividade biológica para tais compostos devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso no qual o ensaio é realizado.

Também, foram determinados os coeficientes de partição destes derivados com a finalidade de se estabelecer, se possível, relação entre as propriedades hidrofóbicas da molécula e suas interações com o *M. tuberculosis*.

Além das substâncias sintetizadas por meio da metodologia racional, foram sintetizados mais dois compostos de estruturas análogas aos derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos benzidrazídicos (Figura 36).

Figura 36. Análogos estruturais dos derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos.

Sendo a isoniazida uma hidrazida, decidiu-se realizar a síntese de seu derivado tiofilidênico, aqui denominado de composto 19. Esperava-se obter um composto de atividade igual ou superior à do protótipo benzidrazídico, uma vez que há a hibridação de dois grupos farmacofóricos no composto, o 5-nitrotiofilideno e a isoniazida.

O composto 20 foi obtido ao acaso, como produto não esperado da reação de síntese dos derivados benzidrazídicos.

Por fim, estudaram-se as condições reacionais para a obtenção de pró-fármacos poliméricos dos análogos 5-nitro-2-heterocíclicos benzidrazídicos. Nestes estudos utilizou-se a isoniazida como fármaco, para se estabelecer as condições reacionais. Destes estudos, apresentados no Apêndice B, resultou artigo publicado (Rando *et al.*, 2005).

As análises estruturais dos derivados sintetizados encontram-se no apêndice A, parte 1.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) apresentaram sinais que comprovam as estruturas esperadas para os compostos sintetizados. Apenas para o composto 16 a solubilidade deste no solvente deuterado não foi suficiente para a obtenção de espectro com definição que possibilitasse a visualização do sinal referente ao C2 quaternário, presente no anel tiofilidênico. Entretanto, para os demais compostos, os espectros correspondem ao perfil esperado. Vale ressaltar, ainda, que todos os espectros foram obtidos mediante uso de *probe* inverso*, o que acarreta menor sensibilidade nas aquisições para experimentos de carbono 13.

Os espectros no infravermelho relacionam as principais bandas indicativas da estrutura dos compostos obtidos. Embora de boa resolução, a análise dos espectros é dificultada, uma vez que a maioria das bandas de estiramento para os grupos funcionais característicos, em particular para produtos finais, cai em regiões bastante próximas. Ainda assim, tais espectros confirmam a presença dos compostos sintetizados, por vezes adicionados de uma molécula de água, como comprovado, também, por meio das análises elementares (microanálises) (Tabela IX).

Em geral, as sínteses destes compostos foram rápidas e fáceis. As etapas de purificação, embora por recristalização, tornaram difícil a separação completa das impurezas, uma vez que estas próprias possuem características físico-químicas muito semelhantes às daquelas dos compostos desejados.

Embora de alta pureza, os solventes deuterados apresentavam água como contaminante, a qual foi eliminada por meio de supressão durante a aquisição dos espectros. Este procedimento, entretanto, pode ocasionar integração errônea dos picos, uma vez que os

* utilizado por problemas com o *probe* normal.

sinais correspondentes aos prótons do NH_2 de hidrazidas e/ou de aminas possuem deslocamentos químicos muito próximos ao da água suprimida.

Para os compostos intermediários de síntese (hidrazidas e ésteres) foi realizada cromatografia a gás, a fim de se analisar a pureza de tais compostos (Tabela IX). Entretanto, para os compostos finais, a análise cromatográfica é inviável devido ao grupo nitro presente em sua estrutura, que lhe confere alta polaridade e, conseqüentemente, acarreta alta afinidade destes compostos pela fase estacionária da coluna. Suas purezas foram, então, atestadas pelas microanálises realizadas, garantindo, assim, a confiabilidade dos resultados biológicos.

Tabela IX. Análises estruturais gerais dos compostos sintetizados

Composto	Rendimento (%)	Pureza cromatográfica(%)	Faixa de Fusão (°C)	Microanálise (%)	
				Calculado	Observado
1	a	100	-34	---	---
2	99	96,50	44-47	---	---
3	87	100	49-52	---	---
4	91	98,38	79-82	---	---
5	69	77,00	111-115	---	---
6	95	100	121-123	---	---
7	72	97,00	112-115	---	---
8	65	83,57	185-187	---	---
9	74	89,46	117-127	---	---
10	77	100	158-162	---	---
11	76	100	218-220	---	---
12	63	100	255-257	---	---
13	96	b	220-223	C = 52,36 H = 3,30 N = 15,26	C = 50,99 H = 3,33 N = 15,34
14	71	b	272-275	C = 43,98 H = 3,08 N = 12,82	C = 44,36 H = 3,18 N = 12,54 ^c
15	82	b	195 ^e	C = 51,14 H = 3,63 N = 13,76	C = 50,23 H = 3,54 N = 14,00
16	92	b	255-257	C = 52,83 H = 4,40 N = 17,61	C = 50,92 H = 4,27 N = 17,30
17	95	b	260 ^e	C = 46,71 H = 3,24 N = 18,16	C = 47,29 H = 3,74 N = 18,20 ^c
18	95	b	260 ^e	C = 49,48 H = 3,11 N = 14,43	C = 48,76 H = 3,09 N = 14,32
19	4 ^d	b	238-241	C = 44,86 H = 2,72 N = 19,03	C = 44,21 H = 3,50 N = 17,94 ^c
20	94	b	208-210	C = 38,71 H = 1,94 N = 18,06	C = 38,64 H = 1,69 N = 18,41

^a comercial, ^b produtos contendo grupo nitro não puderam ser analisados via cromatografia a gás devido à sua alta polaridade e, portanto, alta afinidade com a fase estacionária, ^c com uma molécula de água adsorvida, ^d rendimento a ser melhorado; ^e decomposição.

Merece atenção o composto 20, o qual foi obtido da reação de hidrazidas contendo um átomo de nitrogênio na posição *para* do anel com o diacetato de 5-nitro-2-tiofilideno, em meio ácido.

Este composto apresentou características físico-químicas diferentes daquelas até então obtidas para os derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos, anteriormente sintetizados. Após recristalização de dimetilformamida, formaram-se cristais de coloração alaranjada, aciculares e brilhantes.

Os espectros de RMN, tanto de hidrogênio quanto de carbono, apresentaram sinais distintos e com deslocamentos químicos mais elevados. A confirmação da estrutura do composto foi realizada por meio de análise elementar e de espectroscopia de massas. O pico do íon molecular obtido para este composto foi 310.

A reação de conjugação com o 5-nitro-2-tiofenocarboxaldeído liberado *in situ* ocorre, preferencialmente, na posição 2, uma vez que nitrogênios amídicos são fracamente nucleofílicos por terem seu par de elétrons em ressonância com a carbonila (Figura 37).

Figura 37. Nitrogênios de hidrazidas.

Entretanto, a literatura descreve que é possível acilar completamente hidrazidas mediante utilização de excesso de anidrido (Young, Durrel, Dresdner, 1962). Esta reação mostra que mesmo sendo o nitrogênio 1 amídico, ele ainda conserva nucleofilicidade suficiente para reagir com o anidrido (Figura 38).

Figura 38. Acilação completa de hidrazidas.

Uma possível explicação para a obtenção do composto 20 está esquematizada a seguir (Figura 39).

Figura 39. Hipótese de mecanismo de reação para obtenção do composto 20.

Após a reação preliminar com 5-nitro-2-tiofenocarboxaldeído, o composto benzidrazídico, em meio ácido e etanol, reage com o aldeído para formar o intermediário E. Este, por sua vez, instável, reage com o etanol do meio para formar o composto F, liberando o éster do ácido isonicotínico.

Este composto é obtido como produto final da reação de síntese do derivado 5-nitro-2-tiofilidênico benzidrazídico, sendo, portanto, este último, o intermediário da reação.

Característica importante desta reação é que ela foi observada apenas durante as reações entre hidrazidas contendo um átomo de nitrogênio na posição *para* do anel (ou no caso da isoniazida, inserido no anel).

Substituintes amínicos, como o dimetilamino ((CH₃)₂N), em anéis aromáticos são conhecidos como *orto-para* dirigentes, isto é, doam elétrons ao anel aromático ativando, por ressonância, tais posições (Figura 40). Devido à alta densidade eletrônica no carbono aromático, o carbono carbonílico, vizinho a este carbono, torna-se mais suscetível a ataques nucleofílicos.

Tabela X. Dados da atividade contra *M. tuberculosis* e Log P_{app}

Composto	CIM ^a ($\mu\text{g/mL}$)	CIM (nmol/L)	Clog P^b	log P_{app}^c
13	12,5	45,6	2,07	$2,41 \pm 0,01$
14	>200	>646,2	2,98	$3,27 \pm 0,01$
15	2,0	6,6	2,27	$2,58 \pm 0,01$
16	4,0	12,6	2,67	$2,54 \pm 0,01$
17	4,0	13,8	1,62	$1,49 \pm 0,1$
18	4,0	13,7	2,09	$2,04 \pm 0,01$
19	< 2,0	< 7,25	não calculado	não determinado
20	< 2,0	< 6,45	não calculado	não determinado
Padrão	CIM ^a ($\mu\text{g/mL}$)	CIM (nmol/L)	Clog P^b	log P_{app}^c
isoniazida	0,5	3,6	-0,74	-0,70 ^d

^a obtido pelo método da microdiluição; ^b obtido por meio do programa Clog P para Windows versão 1.0.0, 1995, BioByte Corp., USA; ^c Valores obtidos em pH = 7.40 (Tampão Trizma, μ = 0,10 M, NaCl); t = 23 ± 1 °C; ^d valor da literatura (Hansch, Sames, Taylor, 1990).

Estes resultados de Clog P foram gentilmente calculados pelo Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares do Departamento de Tecnologia Químico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, SP.

Os resultados de atividade biológica apresentados são referentes à atividade frente ao *M. tuberculosis* das cepas Ra e Rv.

Vale lembrar que, na metodologia de Topliss, a atividade biológica de um análogo determina a síntese do seguinte. Assim, a escolha dos substituintes seguiu o seguinte caminho na árvore de decisão aromática de Topliss (1997) (Figura 42).

Figura 42. Escolha dos substituintes segundo metodologia de Topliss.

Todos os compostos, com exceção do derivado 4-Cl substituído (composto 14), apresentaram atividade. Estes resultados são bastante promissores considerando-se a complexidade da parede micobacteriana.

O composto 15 (4-OMe) mostrou-se o mais ativo da série, sendo cerca de sete vezes mais potente que o análogo não substituído (composto 13). Estes apresentaram valores de CIM de 6,6 e 45,6 nmol/mL, respectivamente.

Também, deve ser considerado como um composto promissor quando comparado à isoniazida, principal fármaco de escolha nos tratamentos da tuberculose, a qual exibe valores de CIM de 3,6 nmol/mL.

Considerando-se o Diagrama de Topliss, a natureza das propriedades físico-químicas do substituinte 4-OMe indica, em geral, que compostos mais potentes seriam obtidos por meio da escolha de substituintes que apresentem características hidrofílicas e que sejam doadores de elétron ($\sigma < 0$). Como a hidrofílicidade acrescentada à molécula pelo substituinte OMe não é alta, é mais lógico concluir que o aumento da hidrofílicidade dado pelo substituinte leve a um

equilíbrio de hidrofobicidade da molécula completa do que concluir que substituintes mais hidrofílicos sejam preferíveis

Com o objetivo de verificar a contribuição do parâmetro eletrônico, o derivado 16 ($\sigma = -0,83$; $\log P_{app} = 2,54$) foi sintetizado. Este composto mostrou $\log P_{app}$ próximo ao do composto 15 ($\sigma = -0,27$; $\log P_{app} = 2,58$). Considerando-se a maior atividade antimicobacteriana (Tabela X) do derivado 15, cujo substituinte tem caráter menos doador que aquele do composto 16, pode-se concluir, preliminarmente, que o efeito eletrônico teve razoável contribuição na atividade, ainda que sem a importância a que previamente atribuímos.

Embora pareça que a inibição, *in vitro*, do crescimento das cepas Rv de *M. tuberculosis* seja principalmente descrita por parâmetros eletrônicos, não se pode assegurar que a conclusão é correta, uma vez que os dois substituintes subseqüentes, sugeridos pela metodologia, – OH ($\sigma = -0,37$; $\log P_{app} = 2,04$); NH₂ ($\sigma = -0,66$; $\log P_{app} = 1,49$) – mostram contribuições hidrofóbicas e eletrônicas variando em paralelo e atividade biológica menor que a do derivado metoxilado.

Uma vez que o $\log P_{app}$ inclui correções de ionização, a inclusão do composto dissustituído (3-CH₃, 4-OCH₃), sugerido pela árvore de decisão de Topliss, não foi necessária (Topliss, 1972).

Sabe-se que a metodologia de Topliss apresenta limitações, principalmente com respeito a se restringir a um número pequeno de substituintes, levando à colinearidade entre as variáveis físico-químicas. Ademais, as variações, não raro, drásticas nos parâmetros utilizados não levam em conta, geralmente, aquelas intermediárias, mais estreitas. Entretanto, a proposição inicial de se obter o derivado de melhor atividade dentro da série, em curto período de tempo e em menor número de etapas, foi alcançada.

Este se constitui em protótipo de atividade promissora, a partir do qual serão realizados estudos de QSAR e outros mais avançados.

Os compostos 19 e 20, não propostos pela metodologia, apresentaram atividades interessantes, constituindo-se, também, em protótipos a serem explorados.

É importante ressaltar, ainda, que o composto 20, em particular, apresentou atividade também frente a *M. maomense* (MIC = 16,0 µg/mL) e *M. avium* (MIC ≤ 8,0 µg/mL).

5.2. PARTE 2: SÍNTESE PARALELA E ESTUDOS DE QSAR

Os resultados sintéticos apresentados nesta segunda parte do projeto de doutorado foram obtidos em trabalho conjunto desenvolvido durante 11 meses de estágio “sanduíche” no Department of Medicinal Chemistry, University of Mississippi, Oxford, MS, Estados Unidos da América, sob a supervisão do Dr. Mitchell A. Avery.

Os estudos de QSAR-2D e 3D foram desenvolvidos no LAPEN (Laboratório de Planejamento e Síntese de Quimioterápicos Potencialmente Ativos contra Endemias Tropicais), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, SP.

5.2.1. Planejamento da biblioteca

5.2.1.1. Escolha dos análogos

A estrutura protótipo para as moléculas da biblioteca sintetizada é mostrada na Figura 43. Esta estrutura geral é correlacionada à estrutura do nitrofural, potente agente antimicrobiano utilizado principalmente no tratamento de queimaduras e infecções do trato genito-urinário (Korolkovas, 1988). Como visto na parte 1 desta seção “Resultados e Discussões” estes compostos vinham sendo estudados no trabalho de mestrado e constituíram-se na base para o desenvolvimento de projeto mais amplo para o doutorado direto.

Figura 43. Estrutura geral da biblioteca sintetizada.

Neste projeto, optou-se pela aplicação da síntese paralela que, embora leve à produção de bibliotecas menores, é ideal para a aplicação conjunta com técnicas de análise de relação quantitativa estrutura química-atividade biológica (QSAR) por permitir a identificação direta da atividade biológica dos compostos obtidos.

Considerando-se que modificações na posição 2 do anel heterocíclico acarretam alterações no potencial redox do grupo nitro e que a estrutura básica nitro-heterocíclica seja completamente ressonante, substituintes no anel benzênico, capazes de retirar ou doar elétrons para o sistema, poderiam interferir com a atividade biológica destes compostos.

Desta maneira, os substituintes R_1 e R_2 foram escolhidos considerando-se contribuições eletrônicas e hidrofóbicas de diferentes átomos ou grupos químicos nas posições *meta* e *para* de anéis benzênicos. Para tanto, utilizaram-se as constantes σ e π , as quais representam valores numéricos para tais contribuições (Figura 44).

Valores positivos de π correspondem a grupos que aumentam a lipofilicidade total da molécula, enquanto valores negativos conduzem ao decréscimo desta característica. Valores positivos de σ indicam átomos ou grupos químicos retiradores de elétrons enquanto valores negativos representam doadores de elétrons.

Vale ressaltar que um mesmo átomo ou grupo químico apresenta valores diferentes de σ , dependendo de sua posição no anel aromático. Embora o mesmo ocorra com o valor de π , coleções revisadas desse parâmetro normalizam essas diferenças (Kubinyi, 1993).

R	π	σ meta	σ para
H	0	0	0
Cl	0,71	0,37	0,23
OCH ₃	-0,02	0,12	-0,27
N(CH ₃) ₂	0,18	-0,15	-0,83
NH ₂	-1,23	-0,16	-0,66
OH	-0,67	0,12	-0,37
CH ₃	0,56	-0,07	-0,17
CF ₃	0,88	0,43	0,54
NO ₂	-0,28	0,71	0,78

(a)

(b)

Figura 44. a) Relação dos substituintes R_1 ou R_2 escolhidos e suas respectivas contribuições eletrônicas (σ) e hidrofóbicas (π); b) Diagrama de Craig (Craig, 1971) para os substituintes da relação mostrada em (a).

Desta maneira, foi proposta a síntese de biblioteca de cerca de 50 compostos abrangendo representantes nitrofurânicos e nitrotiofênicos mono e dissustituídos.

Para os compostos dissustituídos, a escolha baseou-se, não só nas contribuições eletrônicas e hidrofóbicas dos substituintes individualmente, mas também no efeito destes quando presentes, simultaneamente, nas posições *meta* e *para* do anel benzênico.

A tabela XI mostra como as contribuições eletrônicas e hidrofóbicas de cada substituinte, correspondentes às constantes σ e π , podem ser combinadas com o objetivo de racionalizar a escolha dos compostos dissustituídos.

Tabela XI. Critérios para a escolha dos substituintes R_1 e R_2 para os derivados dissustituídos

Caso	Substituinte	π		σ		Comentários
		>0	<0	>0	<0	
1	R_{para}	•		•		Os dois R são retiradores de elétrons e aumentam a hidrofobicidade geral do produto final
	R_{meta}	•		•		
2	R_{para}	•			•	Os dois R são doadores de elétrons e aumentam a hidrofobicidade geral do produto final
	R_{meta}	•			•	
3	R_{para}		•	•		Os dois R são retiradores de elétrons e diminuem a hidrofobicidade geral do produto final
	R_{meta}		•	•		
4	R_{para}		•		•	Os dois R são doadores de elétrons e diminuem a hidrofobicidade geral do produto final
	R_{meta}		•		•	
5	R_1	•		•		Os dois R são retiradores de elétrons, mas diferem quanto à contribuição hidrofóbica
	R_2		•	•		
6	R_1	•			•	Os dois R são doadores de elétrons, mas diferem quanto à contribuição hidrofóbica
	R_2		•		•	
7	R_1		•	•		Os dois R são retiradores de elétrons, mas diferem quanto à contribuição hidrofóbica
	R_2	•		•		
8	R_1		•		•	Os dois R são doadores de elétrons, mas diferem quanto à contribuição hidrofóbica
	R_2	•			•	

Nos casos 1 a 4 a escolha de substituintes R_1 e R_2 com características similares reforça as contribuições eletrônicas e hidrofóbicas, numa situação de “sinergismo” de contribuições. Já para os casos 5 a 8, foram eleitos substituintes que apresentam diferentes contribuições hidrofóbicas, enquanto suas contribuições eletrônicas não são modificadas.

Não foram considerados os casos de diferentes contribuições eletrônicas e mesmas contribuições hidrofóbicas visto que a contribuição eletrônica de um substituinte pode anular ou diminuir o efeito do outro.

Com base nestes critérios, os compostos propostos para cada caso são relacionados na Figura 45.

<p><u>Caso 1</u> $R_1 = R_2 = \pi^+ / \sigma^+$</p> <table><tr><th>$R_1$</th><th>$R_2$</th></tr><tr><td>Cl</td><td>Cl</td></tr><tr><td>F</td><td>F</td></tr><tr><td>F</td><td>Cl</td></tr><tr><td>Cl</td><td>CF₃</td></tr><tr><td>Cl</td><td>Ph</td></tr><tr><td>CF₃</td><td>Ph</td></tr></table>	R_1	R_2	Cl	Cl	F	F	F	Cl	Cl	CF ₃	Cl	Ph	CF ₃	Ph	<p><u>Caso 2</u> $R_1 = R_2 = \pi^+ / \sigma^-$</p> <table><tr><th>$R_1$</th><th>$R_2$</th></tr><tr><td>N(Me)₂</td><td>N(Me)₂</td></tr><tr><td>CH₃</td><td>CH₃</td></tr><tr><td>N(Me)₂</td><td>CH₃</td></tr><tr><td>CH₃</td><td>N(Me)₂</td></tr><tr><td>isopropil</td><td>CH₃</td></tr><tr><td>CH₃</td><td>isopropil</td></tr></table>	R_1	R_2	N(Me) ₂	N(Me) ₂	CH ₃	CH ₃	N(Me) ₂	CH ₃	CH ₃	N(Me) ₂	isopropil	CH ₃	CH ₃	isopropil	<p><u>Caso 3</u> $R_1 = R_2 = \pi^- / \sigma^+$</p> <table><tr><th>$R_1$</th><th>$R_2$</th></tr><tr><td>NO₂</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>NO₂</td><td>OH</td></tr><tr><td>NO₂</td><td>NO₂</td></tr><tr><td>CN</td><td>CN</td></tr><tr><td>NO₂</td><td>CN</td></tr><tr><td>CN</td><td>NO₂</td></tr></table>	R_1	R_2	NO ₂	OCH ₃	NO ₂	OH	NO ₂	NO ₂	CN	CN	NO ₂	CN	CN	NO ₂	<p><u>Caso 4</u> $R_1 = R_2 = \pi^- / \sigma^-$</p> <table><tr><th>$R_1$</th><th>$R_2$</th></tr><tr><td>OCH₃</td><td>NH₂</td></tr><tr><td>NH₂</td><td>NH₂</td></tr><tr><td>OH</td><td>NH₂</td></tr></table>	R_1	R_2	OCH ₃	NH ₂	NH ₂	NH ₂	OH	NH ₂		
R_1	R_2																																																						
Cl	Cl																																																						
F	F																																																						
F	Cl																																																						
Cl	CF ₃																																																						
Cl	Ph																																																						
CF ₃	Ph																																																						
R_1	R_2																																																						
N(Me) ₂	N(Me) ₂																																																						
CH ₃	CH ₃																																																						
N(Me) ₂	CH ₃																																																						
CH ₃	N(Me) ₂																																																						
isopropil	CH ₃																																																						
CH ₃	isopropil																																																						
R_1	R_2																																																						
NO ₂	OCH ₃																																																						
NO ₂	OH																																																						
NO ₂	NO ₂																																																						
CN	CN																																																						
NO ₂	CN																																																						
CN	NO ₂																																																						
R_1	R_2																																																						
OCH ₃	NH ₂																																																						
NH ₂	NH ₂																																																						
OH	NH ₂																																																						
<p><u>Caso 5</u> $R_1 = \pi^+ / \sigma^+$ $R_2 = \pi^- / \sigma^+$</p> <table><tr><th>R_1</th><th>R_2</th></tr><tr><td>Cl</td><td>NO₂</td></tr><tr><td>Cl</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>Cl</td><td>OH</td></tr><tr><td>CF₃</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>CF₃</td><td>OH</td></tr><tr><td>CF₃</td><td>NO₂</td></tr></table>	R_1	R_2	Cl	NO ₂	Cl	OCH ₃	Cl	OH	CF ₃	OCH ₃	CF ₃	OH	CF ₃	NO ₂	<p><u>Caso 6</u> $R_1 = \pi^- / \sigma^+$ $R_2 = \pi^+ / \sigma^+$</p> <table><tr><th>R_1</th><th>R_2</th></tr><tr><td>NO₂</td><td>Cl</td></tr><tr><td>NO₂</td><td>CF₃</td></tr><tr><td>CN</td><td>Cl</td></tr><tr><td>CN</td><td>CF₃</td></tr></table>	R_1	R_2	NO ₂	Cl	NO ₂	CF ₃	CN	Cl	CN	CF ₃	<p><u>Caso 7</u> $R_1 = \pi^+ / \sigma^-$ $R_2 = \pi^- / \sigma^-$</p> <table><tr><th>R_1</th><th>R_2</th></tr><tr><td>CH₃</td><td>NH₂</td></tr><tr><td>CH₃</td><td>OH</td></tr><tr><td>CH₃</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>N(Me)₂</td><td>NH₂</td></tr><tr><td>N(Me)₂</td><td>OH</td></tr><tr><td>N(Me)₂</td><td>OCH₃</td></tr></table>	R_1	R_2	CH ₃	NH ₂	CH ₃	OH	CH ₃	OCH ₃	N(Me) ₂	NH ₂	N(Me) ₂	OH	N(Me) ₂	OCH ₃	<p><u>Caso 8</u> $R_1 = \pi^- / \sigma^-$ $R_2 = \pi^+ / \sigma^-$</p> <table><tr><th>R_1</th><th>R_2</th></tr><tr><td>OCH₃</td><td>CH₃</td></tr><tr><td>NH₂</td><td>CH₃</td></tr><tr><td>OCH₃</td><td>N(Me)₂</td></tr><tr><td>NH₂</td><td>N(Me)₂</td></tr><tr><td>OH</td><td>N(Me)₂</td></tr><tr><td>OH</td><td>CH₃</td></tr></table>	R_1	R_2	OCH ₃	CH ₃	NH ₂	CH ₃	OCH ₃	N(Me) ₂	NH ₂	N(Me) ₂	OH	N(Me) ₂	OH	CH ₃
R_1	R_2																																																						
Cl	NO ₂																																																						
Cl	OCH ₃																																																						
Cl	OH																																																						
CF ₃	OCH ₃																																																						
CF ₃	OH																																																						
CF ₃	NO ₂																																																						
R_1	R_2																																																						
NO ₂	Cl																																																						
NO ₂	CF ₃																																																						
CN	Cl																																																						
CN	CF ₃																																																						
R_1	R_2																																																						
CH ₃	NH ₂																																																						
CH ₃	OH																																																						
CH ₃	OCH ₃																																																						
N(Me) ₂	NH ₂																																																						
N(Me) ₂	OH																																																						
N(Me) ₂	OCH ₃																																																						
R_1	R_2																																																						
OCH ₃	CH ₃																																																						
NH ₂	CH ₃																																																						
OCH ₃	N(Me) ₂																																																						
NH ₂	N(Me) ₂																																																						
OH	N(Me) ₂																																																						
OH	CH ₃																																																						

Figura 45. Substituintes propostos para a síntese de análogos dissustituídos.

Nem todos os compostos propostos puderam ser sintetizados visto que nem todos os reagentes (ácidos, ésteres ou hidrazidas) são comercialmente disponíveis. Desta forma, apenas os compostos com substituintes marcados em amarelo foram sintetizados.

Embora nem todos os casos tenham sido representados (como o caso 6), os compostos sintetizados podem fornecer informações não só sobre a importância das contribuições, como os análogos monossustituídos, mas também sobre a validade do critério adotado para a escolha dos dissustituídos.

5.2.1.2. Estudos de correlação entre estrutura-química e atividade biológica (QSAR)

Para este projeto optou-se pela aplicação, a princípio, do QSAR-2D por meio do método misto de Hansch-Free-Wilson, analisando-se, assim, a importância das contribuições eletrônicas e hidrofóbicas dos diferentes substituintes e, também, a importância do tipo de anel heterocíclico diretamente ligado ao grupo nitro, por meio de variável indicadora, I. Além disto, esta metodologia possibilita correlacionar os resultados biológicos com diferentes constantes que descrevam tais contribuições, independentemente de terem sido utilizados os parâmetros σ e π para a escolha dos substituintes. Aplicou-se esta metodologia por meio de *softwares* de 2D-QSAR, como Cerius 2[®], entre outros.

Dada a disponibilidade das técnicas, também foi possível realizar estudos de 3D-QSAR. Visto que não se conhece um alvo específico destes compostos, o CoMFA é a técnica de escolha para estudos preliminares de propriedades tridimensionais desta série.

Estes estudos preliminares, foram realizados utilizando-se o programa Sybyl 6.0[®], em estação gráfica Silicon Graphics Octane 2.

5.2.2. Síntese Paralela

Construiu-se uma biblioteca com 64 derivados 5-nitro-heterocíclico benzidrazídicos, os quais são listados nas tabelas XII e XIII, juntamente com os respectivos rendimentos e purezas.

Tabela XII. Derivados monossustituídos

FURANOS					TIOFENOS				
Código	Grupo R		Rendimento (%)	Pureza* (%)	Código	Grupo R		Rendimento (%)	Pureza* (%)
	R _{para}	R _{meta}				R _{para}	R _{meta}		
DBA-1/O	H	H	85	100	DBA-1/S	H	H	91	99
DBA-2/O	Cl	H	95	100	DBA-2/S	Cl	H	87	100
DBA-3/O	OMe	H	52	98	DBA-3/S	OMe	H	85	99
DBA-4/O	N(Me) ₂	H	44	98	DBA-4/S	N(Me) ₂	H	61	99
DBA-5/O	NH ₂	H	70	86	DBA-5/S	NH ₂	H	93	97
DBA-6/O	OH	H	80	99	DBA-6/S	OH	H	86	99
DBA-7/O	Me	H	88	100	DBA-7/S	Me	H	93	99
DBA-8/O	CF ₃	H	83	100	DBA-8/S	CF ₃	H	87	100
DBA-9/O	NO ₂	H	81	97	DBA-9/S	NO ₂	H	84	98
DBA-10/O	H	Cl	95	99	DBA-10/S	H	Cl	93	99
DBA-11/O	H	OMe	73	98	DBA-11/S	H	OMe	85	99
DBA-12/O	H	N(Me) ₂	60	99	DBA-12/S	H	N(Me) ₂	88	99
DBA-13/O	H	NH ₂	----	----	DBA-13/S	H	NH ₂	----	----
DBA-14/O	H	OH	87	99	DBA-14/S	H	OH	86	98
DBA-15/O	H	Me	88	98	DBA-15/S	H	Me	83	99
DBA-16/O	H	CF ₃	83	99	DBA-16/S	H	CF ₃	87	99
DBA-17/O	H	NO ₂	86	100	DBA-17/S	H	NO ₂	93	91

* Pureza determinada por CLAE

Tabela XIII. Derivados dissustituídos

FURANOS					TIOFENOS				
Código	Grupo R		Rendimento (%)	Pureza* (%)	Código	Grupo R		Rendimento (%)	Pureza* (%)
	R _{para}	R _{meta}				R _{para}	R _{meta}		
DBA-18/O	Cl	Cl	71	99	DBA-18/S	Cl	Cl	73	97
DBA-19/O	F	F	81	99	DBA-19/S	F	F	80	99
DBA-20/O	Me	Me	----	----	DBA-20/S	Me	Me	----	----
DBA-21/O	NH ₂	NH ₂	----	----	DBA-21/S	NH ₂	NH ₂	----	----
DBA-22/O	F	Cl	90	100	DBA-22/S	F	Cl	85	99
DBA-23/O	NO ₂	OMe	72	99	DBA-23/S	NO ₂	OMe	60	99**
DBA-24/O	NO ₂	OH	56	99	DBA-24/S	NO ₂	OH	53	99
DBA-25/O	OMe	NH ₂	30	98**	DBA-25/S	OMe	NH ₂	85	99**
DBA-26/O	OH	NH ₂	75	99	DBA-26/S	OH	NH ₂	40	99**
DBA-27/O	Cl	NO ₂	59	98**	DBA-27/S	Cl	NO ₂	61	98
DBA-28/O	Me	NH ₂	49	100**	DBA-28/S	Me	NH ₂	50	98
DBA-29/O	Me	OH	41	----	DBA-29/S	Me	OH	23	99**
DBA-30/O	Me	OMe	53	99	DBA-30/S	Me	OMe	39	99
DBA-31/O	NH ₂	Me	----	----	DBA-31/S	NH ₂	Me	----	----
DBA-32/O	Cl	SO ₂ NH ₂	59	99	DBA-32/S	Cl	SO ₂ NH ₂	63	98

* Pureza determinada por CLAE

** Pureza determinada por CLAE após purificação

Antes de iniciar as sínteses propriamente ditas, foram realizadas reações-teste para adequar as condições reacionais clássicas àquelas condições reacionais em paralelo. Este procedimento foi particularmente importante para separar os reagentes em diferentes grupos de acordo com o tempo necessário para a reação completa. Por exemplo, hidrazidas com substituintes como OH e NH₂ requerem maior tempo de reação que aquelas halogenadas. Além disto, a posição dos átomos ou grupos no anel benzênico também pode levar a maior reatividade frente aos aldeídos: hidrazidas *para*-substituídas reagem mais rápido que as *meta*-substituídas. O tempo de reação, para os diferentes grupos de hidrazidas, variou de 15 minutos a 2 horas. As demais condições reacionais como temperatura, proporção dos reagentes e solventes não foram variadas significativamente.

De forma geral, os produtos monossustituídos foram obtidos com rendimentos mais altos que os dissustituídos. Além disto, a reação entre as hidrazidas monossustituídas e os

aldeídos parece ocorrer de forma quase completa: a precipitação do produto final pode deslocar o equilíbrio da reação para a formação do produto final desejado.

Para a maioria dos compostos dissustituídos, a reação, além de ser um pouco mais lenta, ainda ocorre de forma incompleta. A solubilidade de alguns dos produtos finais dissustituídos na mistura de solventes da reação (EtOH/H₂O) é maior. Desta maneira, a precipitação, que parece deslocar a reação para a formação do produto, não ocorre. Os produtos dissustituídos foram obtidos em misturas com seus materiais de partida e purificados por cromatografia líquida e, em alguns casos, por cromatografia líquida preparativa de alta eficiência.

Os compostos dissustituídos halogenados apresentam menor hidrossolubilidade que seus demais análogos, precipitando, com bons rendimentos, após sua formação.

Os compostos em destaque nas tabelas XII e XIII apresentaram problemas na síntese e não foram obtidos. A maioria destes compostos possui grupo amino em uma das posições de substituição do anel benzênico. Como o produto final é obtido da reação de um grupo NH₂ da hidrazida com aldeído, é possível que tenha ocorrido competição com o grupo NH₂ substituinte, com formação de imina correspondente.

A princípio, planejava-se utilizar número e variedade de substituintes maior, entretanto, a disponibilidade comercial dos reagentes foi fator limitante para a síntese dos compostos. Focalizaram-se, então, as sínteses para os produtos cujos materiais de partida puderam ser adquiridos comercialmente.

Para os derivados monossustituídos, menos de 70% das hidrazidas de partida são comercialmente disponíveis, de forma que as restantes foram sintetizadas a partir ou do ácido benzóico ou do éster metílico correspondente. Já para os derivados dissustituídos, somente os ácidos benzóicos são comercialmente disponíveis.

É importante ressaltar que, embora existam no mercado outros ácidos benzóicos comerciais, a seleção dos reagentes manteve-se baseada nos critérios anteriormente explicados.

A tabela XIV relaciona os materiais de partida sintetizados juntamente com seus respectivos rendimentos.

Tabela XIV. Materiais de partida sintetizados

Ésteres				Hidrazidas			
Código	Grupo R		Rendimento (%)	Código	Grupo R		Rendimento (%)
	R _{para}	R _{meta}			R _{para}	R _{meta}	
Emo-1	H	N(Me) ₂	91	Hmo-1	H	N(Me) ₂	50
Edi-1	Cl	SO ₂ NH ₂	95	Hmo-2	H	CF ₃	68
Edi-2	Cl	Cl	85	Hmo-3	H	Cl	89
Edi-3	F	F	90	Hmo-4	H	NH ₂	82
Edi-4	Me	Me	70	Hmo-5	OMe	H	77
Edi-5	NH ₂	NH ₂	----	Hmo-6	H	Me	95
Edi-6	F	Cl	83	Hmo-7	H	NO ₂	90
Edi-7	NO ₂	OMe	77	Hmo-8	N(Me) ₂	H	74
Edi-8	NO ₂	OH	76	Hdi-1	Cl	SO ₂ NH ₂	45
Edi-9	OMe	NH ₂	67	Hdi-2	Cl	Cl	99
Edi-10	OH	NH ₂	60	Hdi-3	F	F	85
Edi-11	Cl	NO ₂	77	Hdi-4	Me	Me	94
Edi-12	Me	NH ₂	80	Hdi-6	F	Cl	76
Edi-13	Me	OH	83	Hdi-7	NO ₂	OMe	49
Edi-14	Me	OMe	80	Hdi-8	NO ₂	OH	71
Edi-15	NH ₂	Me	51	Hdi-9	OMe	NH ₂	81
				Hdi-10*	OH	NH ₂	20
				Hdi-11	Cl	NO ₂	39
				Hdi-12*	Me	NH ₂	73
				Hdi-13*	Me	OH	41
				Hdi-14	Me	OMe	79
				Hdi-15	NH ₂	Me	70

* Hidrazidas higroscópicas

De um total de 39 ésteres e hidrazidas sintetizados, apenas o éster diamínico (Edi-5) e, portanto, a respectiva hidrazida, não foram obtidos. Entretanto, é provável que após a proteção dos substituintes seja possível obter os reagentes necessários.

Os demais ésteres foram isolados com bons rendimentos e analisados por ¹H-RMN e cromatografia em camada delgada. Nos casos em que não se conseguiu boa resolução no ¹H-RMN, em razão da alta higroscopicidade do produto obtido, utilizou-se como indicativo o perfil cromatográfico obtido na cromatografia em camada delgada (CCD).

As hidrazidas foram obtidas da reação dos ésteres com hidrazina 35% (p/v) em água. Nesta concentração, a água da solução de hidrazina desempenha, também, o papel de

solvente da reação. Embora esta reação não tenha apresentado maiores problemas, algumas das hidrazidas dissubstituídas foram obtidas com rendimentos mais baixos que os esperados.

Em geral, as hidrazidas são isoladas do meio reacional aquoso por resfriamento em banhos de água, água e gelo e até mesmo água e gelo seco, consecutivamente. Entretanto, certas hidrazidas dissubstituídas apresentaram solubilidade em água maior que o normal, sendo, algumas destas, higroscópicas.

Embora a evaporação da água sob aquecimento e pressão reduzida tenha sido tentada, este método não foi o mais adequado, visto que hidrazidas podem ser explosivas quando aquecidas a altas temperaturas. Mantendo-se o aquecimento a temperaturas mais baixas (60 °C) e utilizando-se alto vácuo e força centrífuga (SpeedVac®), mais de 24 horas foram necessárias para a evaporação completa da água. Além disto, vale ressaltar que a mistura reacional contém, também, hidrazina utilizada em excesso para a reação. Este reagente é conhecido por seu alto potencial carcinogênico. Sob estas condições, este reagente também sofre evaporação, sendo liberado no ambiente.

Frente a estes obstáculos, diferentes soluções de hidrazina foram testadas para facilitar a etapa de isolamento, melhorando, assim, o rendimento. Foram testadas:

- × hidrazina monoidratada;
- × solução de hidrazina 1 M em tetraidrofurano (THF);
- × hidrazina 65% (p/v).

As duas primeiras soluções de hidrazina mostraram-se ineficazes para a obtenção das hidrazidas.

A reação com a hidrazina monoidratada, acompanhada por CCD, mostrou a produção de mistura de compostos, que não foram separados, tampouco analisados. Utilizando-se hidrazina 1 M em THF, foram necessárias mais de 5 horas para ocorrer a formação, em baixa concentração, da hidrazida necessária.

Empregando-se a solução de hidrazina mais concentrada e mantendo-se o solvente (solução 65% em água) obtiveram-se as hidrazidas esperadas e o isolamento foi facilitado pela menor quantidade de água no meio reacional. Assim, após a reação, as hidrazidas foram obtidas pela rotaevaporação de cerca de um terço da água do meio, seguida de resfriamento da solução em banhos de água e água e gelo. Para algumas hidrazidas, apenas o resfriamento foi suficiente para sua precipitação. Os produtos precipitados foram filtrados e secados em dessecadores com pentóxido de fósforo. As hidrazidas higroscópicas (por exemplo, Hdi-10, 3-NH₂/4-OH), foram mantidas em dessecador sob pressão reduzida e pentóxido de fósforo e utilizadas para a obtenção dos produtos finais 24 horas após o isolamento.

Devido a esta característica, estas hidrazidas foram pesadas, para reação de obtenção dos produtos finais, em balanças localizadas em ambientes de atmosfera de argônio isenta de umidade (Glove Box).

Embora a prática usual para síntese paralela e combinatória seja a análise estrutural de apenas alguns representantes da biblioteca sintetizada, neste projeto, todos os produtos finais monossustituídos e dissustituídos foram analisados. Isto porque, para a aplicação posterior do QSAR, é necessário comprovar que a atividade biológica obtida é devida a um determinado composto de estrutura conhecida e pureza maior que 97%, garantindo, assim, a confiabilidade do processo.

Em seguida à obtenção, os derivados resultantes foram submetidos a ^1H -RMN, sendo determinada a composição elementar.

As tabelas XV e XVI relacionam os dados de ^1H -RMN e análise elementar obtidos para os produtos finais furânicos e tiofênicos. Os espectros obtidos são compilados no Apêndice A, parte 2.

Tabela XV. Dados analíticos – derivados nitrofurânicos

Compostos	Substituintes		^1H -RMN	Análise Elementar (%)
	R ₁	R ₂		
DBA-1/O	H	H	7,26 (s, 1H, H ₄), 7,54-7,57 (d, J = 7,05, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,60-7,62 (d, J = 6,55, 1H, H ₁₃), 7,78-7,79 (d, J = 3,27, 1H, H ₃), 7,90-7,92 (d, J = 6,30, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,40 (s, 1H, H ₆), 12,23 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 51,94 H = 3,25 N = 15,15 Obtido: C = 51,64 H = 3,87 N = 15,08
DBA-2/O	Cl	H	7,27 (d, 1H, H ₄), 7,59-7,61 (d, J = 7,55, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,76-7,78 (d, J = 3,58, 1H, H ₃), 7,91-7,94 (d, J = 6,76, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,37 (s, 1H, H ₆), 12,28 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 46,20 H = 2,57 N = 13,48 Obtido: C = 45,08 H = 2,88 N = 12,93
DBA-3/O	OMe	H	3,83 (s, 3H, OCH ₃), 7,06-7,08 (d, J = 7,58, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,25 (sl, 1H, H ₄), 7,79-7,81 (d, J = 3,42, 1H, H ₃), 7,90-7,92 (d, J = 8,31, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,38 (s, 1H, H ₆), 12,12 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 53,98 H = 3,83 N = 14,53 Obtido: C = 53,84 H = 3,58 N = 14,41

Tabela XV. Dados analíticos – derivados nitrofurânicos (continuação).

Compostos	Substituintes		¹ H-RMN	Análise Elementar (%)
	R ₁	R ₂		
DBA-4/O	N(Me) ₂	H	2,98 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 6,73-6,75 (d, J = 8,8, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,19-7,20 (d, J = 3,91, 1H, H ₄), 7,78-7,80 (m, 3H, H ₃ , H ₁₁ e H ₁₅), 8,36 (s, 1H, H ₆), 11,93 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 52,50 H = 4,38 N = 17,50 Obtido: C = 52,66 H = 5,08 N = 17,68
DBA-5/O	NH ₂	H	5,89 (s, 2H, NH ₂), 6,58-6,60 (d, J = 8,31, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,19-7,21 (d, J = 3,67, 1H, H ₄), 7,65-7,69 (d, J = 8,07, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 7,77-7,79 (d, J = 3,42, 1H, H ₃), 8,35 (s, 1H, H ₆), 11,85 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 52,55 H = 3,65 N = 20,44 Obtido: C = 52,06 H = 3,52 N = 19,70
DBA-6/O	OH	H	6,84-6,86 (d, J = 8,31, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,21 (sl, 1H, H ₄), 7,77-7,80 (m, 3H, H ₃ , H ₁₁ e H ₁₅), 8,35 (s, 1H, H ₆), 10,21 (sl, 1H, OH), 12,01 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 52,36 H = 3,27 N = 15,27 Obtido: C = 52,28 H = 3,13 N = 15,09
DBA-7/O	Me	H	2,36 (s, 3H, CH ₃), 7,25 (sl, 1H, H ₄), 7,33-7,35 (d, J = 6,16, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,79-7,82 (m, 3H, H ₃ , H ₁₁ e H ₁₅), 8,39 (s, 1H, H ₆), 12,17 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 53,56 H = 3,78 N = 14,42 Obtido: C = 53,42 H = 4,27 N = 14,33
DBA-8/O	CF ₃	H	7,30 (sl, 1H, H ₄), 7,79 (sl, 1H, H ₃), 7,91-7,93 (d, J = 7,55, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 8,10-8,13 (d, J = 7,35, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,40 (s, 1H, H ₆), 12,40 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 47,72 H = 2,46 N = 12,84 Obtido: C = 47,50 H = 2,16 N = 12,68
DBA-9/O	NO ₂	H	7,31 (sl, 1H, H ₄), 7,79 (sl, 1H, H ₃), 8,14-8,15 (d, J = 4,97, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 8,37-8,39 (d, J = 8,74, 3H, H ₆ , H ₁₂ e H ₁₄), 12,49 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 44,69 H = 2,48 N = 17,38 Obtido: C = 45,30 H = 2,88 N = 17,48
DBA-10/O	H	Cl	7,26-7,29 (d, J = 9,74, 1H, H ₁₂), 7,57-7,58 (d, J = 2,78, 1H, H ₄), 7,68 (sl, 1H, H ₃), 7,76-7,79 (d, J = 10,13, 1H, H ₁₃), 7,86 (sl, 1H, H ₆), 7,91-7,94 (d, J = 9,54, 1H, H ₁₁), 8,35-8,38 (d, J = 9,34, 1H, H ₁₅), 12,30 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 46,20 H = 2,57 N = 13,48 Obtido: C = 44,34 H = 3,29 N = 12,73

Tabela XV. Dados analíticos – derivados nitrofurânicos (continuação).

Compostos	Substituintes		¹ H-RMN	Análise Elementar (%)
	R ₁	R ₂		
DBA-11/O	H	OMe	3,82 (s, 3H, OCH ₃), 7,19 (sl, 1H, H ₁₃), 7,27 (sl, 1H, H ₁₂), 7,42-7,48 (m, 3H, H ₃ , H ₄ e H ₁₅), 7,79 (sl, 1H, H ₁₁), 8,40 (s, 1H, H ₆), 12,19 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 53,98 H = 3,83 N = 14,53 Obtido: C = 53,96 H = 3,48 N = 14,39
DBA-12/O	H	N(Me) ₂	2,95 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 6,94-6,95 (d, J = 7,83, 1H, H ₁₃), 7,17 (sl, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 7,25 (sl, 1H, H ₄), 7,31-7,33 (m, 1H, H ₁₂), 7,79 (sl, 1H, H ₃), 8,41 (s, 1H, H ₆), 12,10 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 52,45 H = 4,37 N = 17,48 Obtido: C = 52,78 H = 4,82 N = 17,25
DBA-13/O	H	NH ₂	não obtido	não obtido
DBA-14/O	H	OH	6,96-7,04 (d, J = 3,78, 1H, H ₄), 7,24-7,34 (m, 4H, H ₃ , H ₁₂ , H ₁₃ e H ₁₅), 7,79-7,82 (m, 1H, H ₁₁) 8,40 (s, 1H, H ₆), 9,84 (sl, 1H, OH), 12,17 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 52,37 H = 3,30 N = 15,27 Obtido: C = 52,11 H = 3,19 N = 15,18
DBA-15/O	H	Me	2,40 (s, 3H, CH ₃), 7,26-7,27 (d, J = 2,5, 1H, H ₄), 7,44 (sl, 2H, H ₁₂ e H ₁₃) 7,70-7,73 (m, 2H, H ₁₁ e H ₁₅) 7,79-7,80 (d, J = 3,5, 1H, H ₃), 8,40 (s, 1H, H ₆), 12,20 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 57,14 H = 4,03 N = 15,38 Obtido: C = 56,36 H = 3,94 N = 15,40
DBA-16/O	H	CF ₃	7,30 (sl, 1H, H ₄), 7,79 (sl, 2H, H ₁₂ e H ₃), 7,98-7,99 (d, J = 6,8, 1H, H ₁₃), 8,21-8,23 (d, J = 7,6, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,39 (s, 1H, H ₆), 12,42 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 47,72 H = 2,46 N = 12,84 Obtido: C = 47,49 H = 2,23 N = 12,80
DBA-17/O	H	NO ₂	7,32 (sl, 1H, H ₄), 7,80 (sl, 1H, H ₃), 7,84-7,87 (t, J = 7,70, 1H, H ₁₂), 8,35-8,37 (d, J = 7,09, 1H, H ₁₁), 8,41 (s, 1H, H ₁₅), 8,45-8,47 (d, J = 7,82, 1H, H ₁₃), 8,74 (s, 1H, H ₆), 12,51 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 44,69 H = 2,48 N = 17,38 Obtido: C = 45,50 H = 2,75 N = 17,42
DBA-18/O	Cl	Cl	7,30 (sl, 1H, H ₄), 7,79 -7,80 (d, J = 3,9, 1H, H ₁₂), 7,84-7,85 (d, J = 4,8, 1H, H ₁₁), 7,89 (sl, 1H, H ₁₅), 8,15 (sl, 1H, H ₃), 8,37 (sl, 1H, H ₆), 12,34 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 41,62 H = 2,02 N = 12,14 Obtido: C = 42,04 H = 2,51 N = 11,91

Tabela XV. Dados analíticos – derivados nitrofurânicos (continuação).

Compostos	Substituintes		¹ H-RMN	Análise Elementar (%)
	R ₁	R ₂		
DBA-19/O	F	F	7,29 (sl, 1H, H ₄), 7,62-7,64 (d, J = 8,8, 1H, H ₁₂), 7,79 (m, 2H, H ₃ e H ₁₅), 7,94-7,98 (m, 1H, H ₁₁), 8,36 (s, 1H, H ₆), 12,27 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 46,00 H = 2,24 N = 13,42 Obtido: C = 46,18 H = 2,74 N = 13,46
DBA-20/O	Me	Me	não obtido	não obtido
DBA-21/O	NH ₂	NH ₂	não obtido	não obtido
DBA-22/O	F	Cl	7,29 (sl, 1H, H ₄), 7,58-7,63 (m, 1H, H ₁₂), 7,78-7,79 (d, J = 3,42, 1H, H ₃), 7,89-7,99 (m, 1H, H ₁₁) 8,12-8,14 (d, J = 6,34, 1H, H ₁₅), 8,34 (s, 1H, H ₆), 12,27 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 43,70 H = 2,12 N = 12,75 Obtido: C = 43,89 H = 2,66 N = 13,51
DBA-23/O	NO ₂	OMe	4,01 (s, 3H, OCH ₃), 7,32 (sl, 1H, H ₄), 7,61-7,63 (d, J = 7,34, 1H, H ₁₁), 7,78 (s, 1H, H ₁₅), 7,80 (sl, 1H, H ₃), 8,03-8,05 (d, J = 7,80, 1H, H ₁₂), 8,41 (s, 1H, H ₆), 12,38 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 46,70 H = 2,99 N = 16,78 Obtido: C = 46,67 H = 2,88 N = 16,68
DBA-24/O	NO ₂	OH	7,29 (sl, 1H, H ₄), 7,42-7,44 (d, J = 7,8, 1H, H ₁₁), 7,59 (sl, 1H, H ₁₅), 7,78 (sl, 1H, H ₃), 8,00-8,02 (d, J = 8,1, 1H, H ₁₂), 8,38 (s, 1H, H ₆), 12,37 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 42,60 H = 2,37 N = 16,57 Obtido: C = 42,59 H = 2,93 N = 16,37
DBA-25/O	OMe	NH ₂	3,83 (s, 3H, OCH ₃), 4,97 (s, 2H, NH ₂), 6,88-6,90 (d, J = 8,3, 1H, H ₁₂), 7,17 (s, 1H, H ₄), 7,19-7,22 (d, J = 9,0, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 7,79-7,80 (d, J = 2,9, 1H, H ₃), 8,36 (s, 1H, H ₆), 12,06 (s, 1H, H ₈)	Enviado para análise
DBA-26/O	OH	NH ₂	4,75 (s, 2H, NH ₂), 6,71-6,73 (m, 1H, H ₁₂), 7,02-7,06 (m, 1H, H ₁₅), 7,16-7,21 (m, 2H, H ₄ e H ₁₁), 7,76-7,79 (m, 1H, H ₃), 8,34 (s, 1H, H ₆), 11,93 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 49,66 H = 3,45 N = 19,31 Obtido: C = 48,80 H = 3,56 N = 18,07
DBA-27/O	Cl	NO ₂	7,29 (sl, 1H, H ₄), 7,80 (sl, 1H, H ₃), 7,86-7,88 (d, J = 8,1, 1H, H ₁₂), 8,05-8,07 (d, J = 8,8, 1H, H ₁₁), 8,29 (s, 1H, H ₁₅), 8,40 (s, 1H, H ₆), 12,42 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 42,54 H = 2,07 N = 16,54 Obtido: C = 42,78 H = 2,81 N = 14,42

Tabela XV. Dados analíticos – derivados nitrofurânicos (continuação).

Compostos	Substituintes		¹ H-RMN	Análise Elementar (%)
	R ₁	R ₂		
DBA-28/O	Me	NH ₂	2,07 (s, 3H, CH ₃), 5,08 (s, 2H, NH ₂), 7,01 (sl, 2H, H ₁₂ e H ₁₁), 7,14 (sl, 1H, H ₁₅), 7,20 (d, 1H, H ₄), 7,75-7,76 (d, J = 2,9, 1H, H ₃), 8,38 (s, 1H, H ₆), 12,11 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 49,66 H = 3,45 N = 19,31 Obtido: C = 49,61 H = 3,24 N = 19,56
DBA-29/O	Me	OH	não purificado	não purificado
DBA-30/O	Me	OMe	2,21 (s, 3H, CH ₃), 3,87 (s, 3H, OCH ₃), 7,27 (sl, 1H, H ₄), 7,29-7,31 (d, J = 7,58, 1H, H ₁₂), 7,43-7,45 (d, J = 7,80, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 7,79-7,80 (d, J = 2,9, 1H, H ₃), 8,41 (s, 1H, H ₆), 12,14 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 55,40 H = 4,29 N = 13,90 Obtido: C = 53,95 H = 4,30 N = 13,38
DBA-31/O	NH ₂	Me	não obtido	não obtido
DBA-32/O	Cl	SO ₂ NH ₂	7,31 (sl, 1H, H ₄), 7,77-7,80 (m, 3H, H ₃ e SO ₂ NH ₂), 7,85-7,87 (d, J = 7,83, 1H, H ₁₂), 8,12-8,14 (d, J = 7,30, 1H, H ₁₁), 8,41 (sl, 1H, H ₁₅), 8,52 (s, 1H, H ₆), 12,48 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 38,66 H = 2,42 N = 15,03 Obtido: C = 39,20 H = 2,49 N = 15,33

* Valores com uma molécula de água adsorvida,

Tabela XVI. Dados analíticos – derivados nitrotiofênicos

Compostos	Substituintes		¹ H-RMN	Análise Elementar
	R ₁	R ₂		
DBA-1/S	H	H	7,51-7,60 (m, 4H, H ₄ , H ₁₂ , H ₁₃ e H ₁₄), 7,88-7,90 (d, J = 6,9, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,12 (sl, 1H, H ₃), 8,67 (s, 1H, H ₆), 12,22 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 52,31 H = 3,27 N = 15,26 Obtido: C = 52,21 H = 3,24 N = 15,34
DBA-2/S	Cl	H	7,60-7,62 (m, 3H, H ₄ , H ₁₂ e H ₁₄), 7,91-7,93 (d, J = 7,8, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,12 (s, 1H, H ₃), 8,65 (s, 1H, H ₆), 12,28 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 46,49 H = 2,58 N = 13,56 Obtido: C = 46,22 H = 2,39 N = 13,70
DBA-3/S	OMe	H	3,83 (s, 3H, OCH ₃), 7,05-7,07 (d, J = 8,60, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,55-7,56 (d, J = 3,18, 1H, H ₄), 7,88-7,90 (d, J = 7,80, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,11-8,12 (d, J = 3,9, 1H, H ₃), 8,66 (s, 1H, H ₆), 12,10 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 51,15 H = 3,61 N = 13,77 Obtido: C = 50,48 H = 3,42 N = 13,72
DBA-4/S	N(Me) ₂	H	2,97 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 6,72-6,74 (d, J = 8,8, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,49-7,50 (d, J = 3,9, 1H, H ₄), 7,77-7,79 (d, J = 8,8, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,09-8,10 (d, J = 4,2, 1H, H ₃), 8,63 (s, 1H, H ₆), 11,91 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 50,00 H = 4,17 N = 16,67 Obtido: C = 49,91 H = 4,51 N = 16,80
DBA-5/S	NH ₂	H	5,86 (s, 2H, NH ₂), 6,56-6,58 (d, J = 8,3, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,48-7,49 (d, J = 3,7, 1H, H ₄), 7,62-7,64 (d, J = 8,3, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,08-8,09 (d, J = 3,9, 1H, H ₃), 8,59 (s, 1H, H ₆), 11,82 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 49,60 H = 3,44 N = 19,29 Obtido: C = 49,07 H = 3,37 N = 19,26
DBA-6/S	OH	H	6,85-6,87 (d, J = 8,3, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,53-7,54 (d, J = 3,9, 1H, H ₄), 7,78-7,80 (d, J = 8,1, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,11-8,12 (d, J = 4,2, 1H, H ₃), 8,64 (s, 1H, H ₆), 10,2 (s, 1H, OH), 12,01 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 49,48 H = 3,11 N = 14,43 Obtido: C = 49,52 H = 2,79 N = 14,35
DBA-7/S	Me	H	2,37 (s, 3H, CH ₃), 7,33-7,35 (d, J = 7,6, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 7,55-7,56 (d, J = 2,9, 1H, H ₄), 7,80-7,82 (d, J = 6,6, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,11-8,12 (d, J = 3,9, 1H, H ₃), 8,67 (s, 1H, H ₆), 12,15 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 50,76 H = 3,58 N = 13,67 Obtido: C = 51,07 H = 3,99 N = 13,64

Tabela XVI. Dados analíticos – derivados nitrotiofênicos (continuação)

Compostos	Substituintes		¹ H-RMN	Análise Elementar
	R ₁	R ₂		
DBA-8/S	CF ₃	H	7,58-7,59 (d, J = 2,77, 1H, H ₄), 7,90-7,92 (d, J = 7,81, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 8,08-8,11 (d, J = 8,81, 3H, H ₃ , H ₁₁ e H ₁₅), 8,66 (s, 1H, H ₆), 12,40 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 45,44 H = 2,33 N = 12,23 Obtido: C = 45,21 H = 2,10 N = 12,42
DBA-9/S	NO ₂	H	7,60 (sl, 1H, H ₄), 8,12-8,13(d, J = 7,1, 3H, H ₃ , H ₁₁ e H ₁₅), 8,36-8,38 (d, J = 8,3, 2H, H ₁₂ e H ₁₄), 8,66 (s, 1H, H ₆), 12,49 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 45,00 H = 2,52 N = 17,49 Obtido: C = 44,62 H = 2,27 N = 17,26
DBA-10/S	H	Cl	7,55-7,59 (m, 2H, H ₄ e H ₁₂), 7,67-7,69 (d, J = 7,3, 1H, H ₁₃), 7,85-7,87 (d, J = 7,3, 1H, H ₁₁), 7,94 (s, 1H, H ₁₅), 8,12-8,13 (d, J = 3,4, 1H, H ₃), 8,65 (s, 1H, H ₆), 12,29 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 46,49 H = 2,58 N = 13,56 Obtido: C = 45,26 H = 2,54 N = 13,27
DBA-11/S	H	OMe	3,82 (s, 3H, OCH ₃), 7,18 (sl, 1H, H ₁₃), 7,44-7,46 (m, 3H, H ₃ , H ₄ e H ₁₂), 7,57 (sl, 1H, H ₁₅), 8,12 (sl, 1H, H ₁₁), 8,68 (s, 1H, H ₆), 12,18 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 48,29 H = 3,41 N = 13,00 Obtido: C = 48,04 H = 3,84 N = 13,04
DBA-12/S	H	N(Me) ₂	2,95 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 6,93-6,95 (d, J = 8,3, 1H, H ₁₃), 7,16 (sl, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 7,30-7,34 (t, J = 8,3, 1H, H ₁₂), 7,55-7,56 (d, J = 3,9, 1H, H ₄), 8,11-8,13 (d, J = 4,4, 1H, H ₃), 8,70 (s, 1H, H ₆), 12,10 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 50,00 H = 4,17 N = 16,67 Obtido: C = 49,29 H = 4,63 N = 16,60
DBA-13/S	H	NH ₂	não obtido	não obtido
DBA-14/S	H	OH	7,00 (sl, 1H, H ₄), 7,28-7,33 (m, 3H, H ₁₂ , H ₁₃ e H ₁₅), 7,57 (sl, 1H, H ₃), 8,13 (s, 1H, H ₁₁), 8,66 (s, 1H, H ₆), 12,15 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 49,44 H = 3,09 N = 14,42 Obtido: C = 49,28 H = 2,85 N = 14,49

Tabela XVI. Dados analíticos – derivados nitrotiofênicos (continuação)

Compostos	Substituintes		¹ H-RMN	Análise Elementar
	R ₁	R ₂		
DBA-15/S	H	Me	2,38 (s, 3H, H ₁₆), 7,41 (sl, 2H, H ₁₂ e H ₁₃), 7,56 (sl, 1H, H ₄), 7,69 (sl, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,11 (sl, 1H, H ₃), 8,66 (s, 1H, H ₆), 12,18 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 50,81 H = 3,58 N = 13,68 Obtido: C = 50,78 H = 4,13 N = 13,85
DBA-16/S	H	CF ₃	7,61-7,62 (d, J = 3,4, 1H, H ₄), 7,78-7,82 (t, J = 7,6, 1H, H ₁₂), 7,98-8,00 (d, J = 7,3, 1H, H ₁₃), 8,13-8,14 (d, J = 3,4, 1H, H ₃), 8,20-8,23 (m, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,67 (s, 1H, H ₆), 12,40 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 43,18 H = 2,21 N = 11,63 Obtido: C = 43,38 H = 2,57 N = 11,53
DBA-17/S	H	NO ₂	7,59-7,60 (d, J = 3,3, 1H, H ₄), 7,82-7,86 (t, J = 8,1, 1H, H ₁₂), 8,11-8,12 (d, J = 4,0, 1H, H ₃), 8,32-8,34 (d, J = 7,6, 1H, H ₁₁), 8,43-8,45 (d, J = 7,8, 1H, H ₁₃), 8,66 (s, 1H, H ₁₅), 8,72 (s, 1H, H ₆), 12,50 (s, 1H, H ₈)	Esperado**: C = 44,17 H = 2,45 N = 17,18 Obtido: C = 44,76 H = 2,44 N = 16,75
DBA-18/S	Cl	Cl	7,63-7,64 (d, J = 4,4, 1H, H ₄), 7,85-7,87 (d, J = 8,3, 1H, H ₁₂), 7,89-7,91 (d, J = 8,8, 1H, H ₁₁), 8,17 (sl, 2H, H ₃ e H ₁₅), 8,66 (s, 1H, H ₆), 12,37 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 41,86 H = 2,03 N = 12,21 Obtido: C = 41,16 H = 2,06 N = 11,81
DBA-19/S	F	F	7,61-7,67 (m, 2H, H ₄ e H ₁₂), 7,80 (sl, 1H, H ₁₅), 7,94-7,98 (t, J = 9,8, 1H, H ₁₁), 8,12-8,13 (d, J = 2,0, 1H, H ₃), 8,65 (s, 1H, H ₆), 12,27 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 46,30 H = 2,25 N = 13,50 Obtido: C = 47,43 H = 2,18 N = 13,67
DBA-20/S	Me	Me	não obtido	não obtido
DBA-21/S	NH ₂	NH ₂	não obtido	não obtido
DBA-22/S	F	Cl	7,62-7,64 (d, J = 8,3, 2H, H ₄ e H ₁₂), 7,95 (sl, 1H, H ₃), 8,13-8,15 (sl, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 8,65 (s, 1H, H ₆), 12,31 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 43,97 H = 2,14 N = 12,82 Obtido: C = 41,95 H = 2,66 N = 12,33

Tabela XVI. Dados analíticos – derivados nitrotiofênicos (continuação)

Compostos	Substituintes		¹ H-RMN	Análise Elementar
	R ₁	R ₂		
DBA-23/S	NO ₂	OMe	3,99 (s, 3H, H ₁₆), 7,57-7,62 (m, 2H, H ₄ e H ₁₁), 7,75 (sl, 1H, H ₁₅), 8,01-8,03 (d, J = 7,8, 1H, H ₁₂) 8,14 (sl, 1H, H ₃), 8,68 (s, 1H, H ₆), 12,37 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 44,60 H = 2,86 N = 16,00 Obtido: C = 44,32 H = 2,93 N = 15,76
DBA-24/S	NO ₂	OH	7,42-7,44 (d, J = 8,3, 1H, H ₁₅), 7,59-7,61 (m, 2H, H ₄ e H ₁₁), 8,00-8,02 (d, J = 8,3, 1H, H ₁₂), 7,13-8,14 (d, J = 3,7, 1H, H ₃), 8,67 (s, 1H, H ₆), 12,37 (s, 1H, H ₈)	Esperado*: C = 40,68 H = 2,26 N = 15,82 Obtido: C = 41,68 H = 2,73 N = 15,74
DBA-25/S	OMe	NH ₂	3,83 (s, 3H, OCH ₃), 4,99 (s, 2H, NH ₂), 6,89-6,91 (d, J = 8,1, 1H, H ₁₂), 7,15-7,19 (m, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 7,53-7,54 (d, J = 3,9, 1H, H ₄), 8,12-8,13 (d, J = 3,9, 1H, H ₃), 8,64 (s, 1H, H ₆), 11,99 (s, 1H, H ₈)	Enviado para análise
DBA-26/S	OH	NH ₂	4,75 (sl, 2H, NH ₂), 6,71-6,74 (d, J = 8,3, 1H, H ₁₂), 7,06-7,08 (d, J = 8,1, 1H, H ₁₅), 7,17 (sl, 1H, H ₁₁), 7,50-7,51 (d, J = 4,3, 1H, H ₄), 8,10-8,11 (d, J = 4,3, 1H, H ₃), 8,64 (s, 1H, H ₆), 11,96 (s, 1H, H ₈)	Higroscópico
DBA-27/S	Cl	NO ₂	7,55-7,56 (s, J = 3,91, 1H, H ₄), 7,70-7,72 (d, J = 8,31, 1H, H ₁₂), 7,79-7,81 (d, J = 8,31, 1H, H ₁₁), 8,11-8,12 (d, J = 3,91, 1H, H ₃), 8,30 (s, 1H, H ₁₅), 8,76 (s, 1H, H ₆), 12,56 (s, 1H, H ₈)	Enviado para análise
DBA-28/S	Me	NH ₂	2,10 (s, 3H, CH ₃), 5,11 (s, 2H, NH ₂), 7,00-7,06 (m, 2H, H ₁₂ e H ₁₁), 7,13 (sl, 1H, H ₁₅), 7,53-7,54 (d, J = 3,7, 1H, H ₄), 7,75-7,76 (d, J = 3,9, 1H, H ₃), 8,98 (s, 1H, H ₆), 12,00 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 45,90 H = 3,53 N = 16,47 Obtido: C = 45,18 H = 3,33 N = 17,45

Tabela XVI. Dados analíticos – derivados nitrotiofênicos (continuação)

Compostos	Substituintes		¹ H-RMN	Análise Elementar
	R ₁	R ₂		
DBA-29/S	Me	OH	2,16 (s, 3H, CH ₃), 7,17-7,91 (d, J = 7,8, 1H, H ₁₂), 7,26-7,28 (d, J = 7,8, 1H, H ₁₁), 7,32 (s, 1H, H ₁₅), 7,52-7,53 (d, J = 3,9, 1H, H ₄), 8,10-8,12 (d, J = 4,2, 1H, H ₃), 8,64 (s, 1H, H ₆), 9,72 (s, 1H, OH), 12,13 (s, 1H, H ₈)	Higroscópico
DBA-30/S	Me	OMe	2,21 (s, 3H, CH ₃), 3,86 (s, 3H, OCH ₃), 7,27-7,30 (d, J = 7,34, 1H, H ₁₂), 7,42 (sl, 2H, H ₁₁ e H ₁₅), 7,56-7,57 (d, J = 3,7, 1H, H ₄), 8,14-8,16 (d, J = 3,9, 1H, H ₃), 8,70 (s, 1H, H ₆), 12,13 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 52,70 H = 4,08 N = 13,17 Obtido: C = 52,72 H = 3,97 N = 12,94
DBA-31/S	NH ₂	Me	não obtido	não obtido
DBA-32/S	Cl	SO ₂ NH ₂	7,60-7,61 (d, J = 2,7, 1H, H ₄), 7,76 (sl, 2H, SO ₂ NH ₂), 7,84-7,86 (d, J = 8,1, 1H, H ₁₂), 8,11-8,14 (m, 2H, H ₃ e H ₁₁), 8,50 (s, 1H, H ₁₅), 8,68 (s, 1H, H ₆), 12,50 (s, 1H, H ₈)	Esperado: C = 37,07 H = 2,32 N = 14,41 Obtido: C = 37,35 H = 2,24 N = 14,62

* Valores com uma molécula de água adsorvida

** Valores com duas moléculas de água adsorvidas

Os espectros de ¹H-RMN apresentaram sinais que comprovam as estruturas esperadas para os compostos sintetizados. Considerando-se que cada amostra requer um mínimo de 6 a 7 horas para obtenção de bons espectros de ¹³C-RMN, tais aquisições não foram realizadas dado o grande número de análogos a serem analisados.

Devido à presença do grupo nitro, alguns produtos finais apresentaram uma ou duas moléculas de água adsorvida à sua estrutura. Estas moléculas, embora não interfiram com a atividade biológica, devem ser consideradas durante a pesagem para preparação das amostras para este propósito. A análise elementar foi utilizada, portanto, não só na análise da estrutura final, como também como indicador da presença de água adsorvida.

Além disto, alguns produtos, como DBA-26/S e DBA-29/S, não puderam ser submetidos a análise elementar, por serem higroscópicos, o que acarreta grandes erros nos resultados obtidos.

É interessante notar que os derivados nitrotiofênicos são capazes de adsorver água com mais facilidade que os análogos nitrofurânicos. Isto é confirmado pelos compostos DBA-17/O e DBA-17/S (3-NH₂), os quais apresentaram uma e duas moléculas de água adsorvidas em suas estruturas, respectivamente, e também pelos análogos higroscópicos DBA-26 (3-NH₂, 4-OH) e DBA-29 (3-OH, 4-CH₃) para os quais somente os análogos nitrotiofênicos mantiveram esta característica, embora os compostos nitrofurânicos derivem da mesma hidrazida higroscópica (Hdi-10 e Hdi-13, respectivamente).

5.2.3. Ensaio Biológicos

As análises biológicas foram realizadas em associação com outros grupos de pesquisa, nos Estados Unidos.

Até o momento, temos disponível as análises biológicas frente aos seguintes parasitos: *Plasmodium falciparum* (malária); *Leishmania donovani* (leishmaniose) e *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose). Os ensaios contra *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas) foram realizados, de forma preliminar, no Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, com a colaboração do Prof. Dr. Sérgio Albuquerque.

5.2.3.1. Leishmaniose

Os ensaios para atividade contra *L. donovani* foram realizados pelo grupo de pesquisa sob orientação do Dr. Babu Lal Tekwani, no centro de pesquisa de produtos naturais, National Center for Natural Product Research, University of Mississippi, USA.

Os testes foram realizados *in vitro*, em cultura de *L. donovani* na faixa de concentração de 10 a 0,01 µg/mL e os resultados foram comparados aos padrões pentamidina e anfotericina B (Tabela XVII). A Tabela XVIII apresenta os resultados de IC₅₀ obtidos como valores médios de ensaios em triplicata, bem como sua conversão em µmol/L e log 1/IC₅₀.

Tabela XVII. Valores de IC₅₀ controle para o ensaio antileishmania da biblioteca

Padrão	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (nmol/L)
Pentamidina	0,63	1,06
Anfotericina B	1,1	1,19

Tabela XVIII. Atividade antileishmania apresentada pelos análogos sintetizados

Amostras	PM	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (nmol/L)	Log 1/IC ₅₀	Amostras	PM	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (nmol/L)	Log 1/IC ₅₀
DBA-1/O	259,22	2,9	11,19	1,049	DBA-1/S	275,28	1,8	6,54	-0,815
DBA-2/O	293,66	2,3	7,83	0,894	DBA-2/S	309,73	0,39	1,26	-0,100
DBA-3/O	289,24	2,6	8,99	0,954	DBA-3/S	305,31	2,2	7,21	-0,858
DBA-4/O	302,29	NA	NA	NA	DBA-4/S	318,35	NA	NA	NA
DBA-5/O	274,23	0,73	2,66	0,425	DBA-5/S	290,30	0,65	2,24	-0,350
DBA-6/O	275,22	0,66	2,40	0,380	DBA-6/S	291,28	0,26	0,89	0,049
DBA-7/O	273,24	3	10,98	1,041	DBA-7/S	289,31	1,3	4,49	-0,653
DBA-8/O	327,22	2,9	8,86	0,948	DBA-8/S	343,28	0,28	0,82	0,088
DBA-9/O	304,22	2	6,57	0,818	DBA-9/S	320,28	0,9	2,81	-0,449
DBA-10/O	293,66	2,3	7,83	0,894	DBA-10/S	309,73	0,85	2,74	-0,438
DBA-11/O	289,24	3	10,37	1,016	DBA-11/S	305,31	2,6	8,52	-0,930
DBA-12/O	302,29	2,4	7,94	0,900	DBA-12/S	318,35	NA	NA	NA
DBA-14/O	275,22	2,8	10,17	1,007	DBA-14/S	291,28	0,8	2,75	-0,439
DBA-15/O	273,24	5,4	19,76	1,296	DBA-15/S	289,31	1,4	4,84	-0,685
DBA-16/O	327,22	3,4	10,39	1,017	DBA-16/S	343,28	1,3	3,79	-0,578
DBA-17/O	304,22	3	9,86	0,994	DBA-17/S	320,28	0,89	2,78	-0,444
DBA-18/O	328,11	0,55	1,68	0,224	DBA-18/S	344	0,14	0,41	0,390
DBA-19/O	295,2	2,8	9,49	0,977	DBA-19/S	311	0,67	2,15	-0,333
DBA-22/O	311,65	2	6,42	0,807	DBA-22/S	327,50	0,63	1,92	-0,284
DBA-23/O	334,24	2,47	7,39	0,869	DBA-23/S	350	0,7	2,00	-0,301
DBA-24/O	320,22	3,17	9,90	0,996	DBA-24/S	336	1,83	5,45	-0,736
DBA-25/O	304,26	5	16,43	1,216	DBA-25/S	320	1,5	4,69	-0,671
DBA-26/O	290,23	7,83	26,98	1,431	DBA-26/S	306	NT	NT	NT
DBA-27/O	338,66	NA	NA	NA	DBA-27/S	354,50	NT	NT	NT
DBA-28/O	288,26	0,18	0,62	-0,205	DBA-28/S	304	0,68	2,24	-0,350
DBA-29/O	289,24	NT	NT	NT	DBA-29/S	305	0,7	2,30	-0,361
DBA-30/O	303,27	2,7	8,90	0,950	DBA-30/S	319	0,7	2,19	-0,341
DBA-32/O	372,74	14,33*	38,45	1,585	DBA-32/S	388,50	3,13	8,06	-0,906

* Resultado do reteste da amostras em faixa de concentração maior que a utilizada.

NA – não ativo nas concentrações testadas

NT – não testados por problemas de solubilidade ou por quantidade insuficiente de amostra.

Estes resultados de IC₅₀ mostram-se promissores, quando comparados aos obtidos para os padrões pentamidina (0,63 µg/mL ou 1,06 nmol/L) e anfotericina B (1,1 µg/mL ou 1,19 nmol/L). Vale ressaltar que os análogos nitrotiofênicos mostram-se, em número, mais ativos, em especial, os derivados 2/S (4-Cl), 6/S (4-OH), 8/S (4-CF₃) e 18/S (3,4-Cl), tendo se encontrado atividade promissora também nos nitrofurânicos DBA-18/O (3,4-Cl) e DBA-28/O. Todos eles exibiram atividade acima da obtida para os fármacos padrão.

Considerando-se os valores apresentados na Tabela XVIII e fazendo-se a distribuição gráfica destes em histograma (Figura 46) pode-se constatar que os derivados nitrotiofênicos mostram-se, de modo geral, muito mais ativos contra o parasito que seus respectivos análogos nitrofurânicos.

* compostos que não apresentaram atividade nas concentrações testadas não foram considerados na construção do histograma.

Figura 46. Distribuição das atividades antileishmania para os análogos nitrofurânicos e nitrotiofênicos.

5.2.3.2. Malária

Os ensaios de malária foram realizados pelo grupo de pesquisa dirigido pela Dra. Shabana Khan, do centro de pesquisa de produtos naturais, National Center for Natural Product Research, University of Mississippi, USA.

Os valores de IC₅₀ foram obtidos de ensaios *in vitro* contra *P. falciparum* cepa D₆ (sensível à cloroquina) e em três diferentes concentrações: 4760, 1587 e 529 ng/mL. Os resultados dos ensaios de IC₅₀ contra a cepa D₆ são listados na Tabela XIX como valores médios de triplicatas em ng/mL juntamente com suas respectivas conversões em nmol/L e Log

1/IC₅₀. A Tabela XX apresenta os valores de IC₅₀ controle para os padrões cloroquina e artemisinina.

Tabela XIX. Atividade contra *P. falciparum* D₆ apresentada pelos análogos sintetizados

Amostras	PM	IC ₅₀ (D ₆)			Amostras	PM	IC ₅₀ (D ₆)		
		ng/mL	μmol/L	log1/IC ₅₀			ng/mL	μmol/L	log1/IC ₅₀
DBA-1/O	259,22	1900	7,33	-0,865	DBA-1/S	275,28	1900	6,90	-0,839
DBA-2/O	293,66	1800	6,13	-0,736	DBA-2/S	309,73	1100	3,55	-0,550
DBA-3/O	289,24	840	2,90	-0,463	DBA-3/S	305,31	684	2,24	-0,350
DBA-4/O	302,29	529	1,75	-0,243	DBA-4/S	318,35	760	2,39	-0,378
DBA-5/O	274,23	2300	8,39	-0,924	DBA-5/S	290,30	630	2,17	-0,336
DBA-6/O	275,22	2267	8,24	-0,916	DBA-6/S	291,28	2900	9,96	-0,998
DBA-7/O	273,24	1085	3,97	-0,599	DBA-7/S	289,31	765	2,64	-0,422
DBA-8/O	327,22	2333	7,13	-0,853	DBA-8/S	343,28	785	2,29	-0,359
DBA-9/O	304,22	2300	7,56	-0,903	DBA-9/S	320,28	1200	3,75	-0,574
DBA-10/O	293,66	2800	9,54	-0,979	DBA-10/S	309,73	805	2,60	-0,415
DBA-11/O	289,24	1750	6,05	-0,782	DBA-11/S	305,31	2500	8,19	-0,913
DBA-12/O	302,29	880	2,91	-0,464	DBA-12/S	318,35	599	1,88	-0,275
DBA-14/O	275,22	580	2,11	-0,346	DBA-14/S	291,28	529	1,82	-0,259
DBA-15/O	273,24	2500	9,15	-0,961	DBA-15/S	289,31	2400	8,30	-0,919
DBA-16/O	327,22	2700	8,21	-0,917	DBA-16/S	343,28	855	2,49	-0,396
DBA-17/O	304,22	2900	9,53	-0,979	DBA-17/S	320,28	1000	3,12	-0,494
DBA-18/O	328,11	2867	8,74	-0,941	DBA-18/S	344,17	755	2,19	-0,341
DBA-19/O	295,20	3400	11,52	-1,094	DBA-19/S	311,27	643	2,07	-0,315
DBA-22/O	311,65	3700	11,87	-1,059	DBA-22/S	327,72	677	2,07	-0,315
DBA-23/O	334,24	3800	11,37	-1,056	DBA-23/S	350,31	887	2,53	-0,403
DBA-24/O	320,22	3200	9,99	-0,981	DBA-24/S	336,28	580	1,73	-0,237
DBA-25/O	304,26	3567	11,72	-1,069	DBA-25/S	320,33	663	2,07	-0,316
DBA-26/O	290,23	1093	3,77	-0,576	DBA-26/S	306,30	NT	NT	NT
DBA-27/O	338,66	NA	NA	NA	DBA-27/S	354,73	NT	NT	NT
DBA-28/O	288,26	2650	9,19	-0,926	DBA-28/S	304,33	310	1,01	-0,005
DBA-29/O	289,24	NT	NT	NT	DBA-29/S	305,31	325	0,92	0,038
DBA-30/O	303,27	1800	5,94	-0,632	DBA-30/S	319,34	1250	4,11	-0,614
DBA-32/O	372,74	630	1,69	-0,228	DBA-32/S	388,81	NA	NA	NA

NA – não ativo nas concentrações testadas; NT – não testados por problemas de solubilidade ou por quantidade insuficiente de amostra.

Tabela XX. Valores de IC₅₀ controle – *P. falciparum* D₆

Padrões	IC ₅₀ D ₆ ng/mL	IC ₅₀ D ₆ μmol/L
Cloroquina	< 26	< 0,08
Artemisinina	< 26	< 0,09

Estes compostos mostraram-se pouco ativos contra *P. falciparum*, quando comparados aos valores obtidos para os fármacos padrão cloroquina e artemisinina.

Podem ser considerados ativos os compostos que apresentam IC₅₀ menor que 1000 ng/mL. Com base neste valor, somente cinco análogos nitrofurânicos apresentaram

alguma atividade frente à cepa sensível à cloroquina (3/O, 4/O, 12/O, 14/O e 32/O) contra 17 análogos nitrotiofênicos ativos.

Esta maior atividade dos análogos nitrotiofênicos, quando comparados aos nitrofurânicos, está de acordo com o padrão observado para a biblioteca no teste contra *L. donovani*.

A distribuição dos dados em histograma facilita a observação (Figura 47).

* compostos que não apresentaram atividade nas concentrações testadas não foram considerados na construção do histograma.

Figura 47. Distribuição das atividades antimaláricas, para a cepa D₆, apresentada pelos análogos nitrofurânicos e nitrotiofênicos

Ensaio contra *P. falciparum* cepa W₂ (resistentes à cloroquina) e ensaios de citotoxicidade frente a células Vero foram realizados simultaneamente e nas mesmas concentrações anteriores.

Os valores médios de triplicatas obtidos nestes ensaios são listados na Tabela XXI. A Tabela XXII traz os valores controle dos padrões para a cepa resistente.

Tabela XXI. Atividade contra *P. falciparum* W₂ e citotoxicidade

Amostras	IC ₅₀ (W ₂) (ng/mL)	IC ₅₀ Vero	Amostras	IC ₅₀ (W ₂) (ng/mL)	IC ₅₀ Vero
DBA-1/O	1285	NC	DBA-1/S	2400	NC
DBA-2/O	2750	NC	DBA-2/S	835	> 4760
DBA-3/O	890	NC	DBA-3/S	1400	NC
DBA-4/O	1750	NC	DBA-4/S	1800	NC
DBA-5/O	1900	NC	DBA-5/S	529	NC
DBA-6/O	1800	NC	DBA-6/S	2000	NC
DBA-7/O	1260	NC	DBA-7/S	529	NC
DBA-8/O	2667	NC	DBA-8/S	1950	> 4760
DBA-9/O	2367	NC	DBA-9/S	1450	NC
DBA-10/O	NA	NC	DBA-10/S	1450	> 4760
DBA-11/O	1300	NC	DBA-11/S	640	NC
DBA-12/O	1100	NC	DBA-12/S	1310	NC
DBA-14/O	800	NC	DBA-14/S	529	> 4760
DBA-15/O	1500	NC	DBA-15/S	2600	NC
DBA-16/O	NA	NC	DBA-16/S	1350	> 4760
DBA-17/O	2700	NC	DBA-17/S	2750	NC
DBA-18/O	3067	NC	DBA-18/S	850	NC
DBA-19/O	3433	NC	DBA-19/S	603	4500
DBA-22/O	4367	NC	DBA-22/S	587	NC
DBA-23/O	NA	NC	DBA-23/S	1017	NC
DBA-24/O	2700	NC	DBA-24/S	1750	NC
DBA-25/O	3933	NC	DBA-25/S	653	NC
DBA-26/O	1167	NC	DBA-26/S	NT	NT
DBA-27/O	NA	NC	DBA-27/S	NT	NT
DBA-28/O	2767	NC	DBA-28/S	327	NC
DBA-29/O	NT	NT	DBA-29/S	547	NC
DBA-30/O	1165	NC	DBA-30/S	2050	NC
DBA-32/O	733	NC	DBA-32/S	NA	NC

NA – não ativo nas concentrações testadas; NT – não testados por problemas de solubilidade ou por quantidade insuficiente de amostra; NC – não citotóxico

Tabela XXII. Valores de IC₅₀ controle – *P. falciparum* W₂

Padrões	IC ₅₀ D ₆ ng/mL	IC ₅₀ D ₆ μmol/L
Cloroquina	115	0,36
Artemisinina	< 26	< 0,08

Como ocorreu frente à cepa sensível à cloroquina D₆, os compostos não mostraram atividade biológica promissora. Também para esta cepa pode-se observar o melhor desempenho dos análogos nitrotiofênicos com relação aos nitrofurânicos.

Entretanto, mesmo sendo mais ativos, os compostos nitrotiofênicos mostraram pequena atividade citotóxica frente a células Vero, enquanto seus análogos nitrofurânicos não

foram citotóxicos. Vale mencionar, no entanto, que os derivados mais ativos da série dos nitrotiofênicos não apresentaram citotoxicidade.

5.2.3.3. Tuberculose

Os ensaios contra *M. tuberculosis* foram realizados pelo grupo de pesquisa Institute for Tuberculosis Research – ITR, School of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, Chicago, USA, sob a supervisão do Dr. Scott Franzblau.

Os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{mol/L}$ e suas conversões em $\text{Log } 1/\text{IC}_{50}$ são apresentados na Tabela XXIII. O valor de CIM obtido para o padrão rifampicina encontra-se na Tabela XXIV.

Tabela XXIII. Atividade contra *M. tuberculosis* apresentada pelos análogos sintetizados

Amostras	PM	CIM ($\mu\text{mol/L}$)	Log 1/CIM	Amostras	PM	CIM $\mu\text{mol/L}$	Log 1/CIM
DBA-1/O	259,22	46,84	-1,670	DBA-1/S	275,28	59,98	-1,778
DBA-2/O	293,66	48,21	-1,683	DBA-2/S	309,73	128	-2,107
DBA-3/O	289,24	NT	NT	DBA-3/S	305,31	12,31	-1,090
DBA-5/O	274,23	128	-2,107	DBA-5/S	290,30	13,40	-1,127
DBA-6/O	275,22	128	-2,107	DBA-6/S	291,28	25,17	-1,401
DBA-7/O	273,24	17,15	-1,234	DBA-7/S	289,31	NT	NT
DBA-8/O	327,22	NT	NT	DBA-8/S	343,28	13,39	-1,127
DBA-9/O	304,22	NT	NT	DBA-9/S	320,28	5,45	-0,736
DBA-10/O	293,66	NT	NT	DBA-10/S	309,73	41,52	-1,618
DBA-11/O	289,24	30,81	-1,489	DBA-11/S	305,31	NT	NT
DBA-12/O	302,29	NT	NT	DBA-14/S	291,28	28,47	-1,454
DBA-14/O	275,22	NT	NT	DBA-15/S	289,31	128	-2,107
DBA-15/O	273,24	7,47	-0,873	DBA-16/S	343,28	4,89	-0,689
DBA-16/O	327,22	26,03	-1,416	DBA-17/S	320,28	128	-2,107
DBA-17/O	304,22	NT	NT	DBA-18/S	344	3,61	-0,558
DBA-18/O	328,11	85,57	-1,932	DBA-19/S	311	8,33	-0,921
DBA-19/O	295,20	5,41	-0,733	DBA-22/S	327,50	10,21	-1,009
DBA-22/O	311,65	7,17	-0,856	DBA-23/S	350	7,42	-0,870
DBA-23/O	334,24	15,39	-1,187	DBA-24/S	336	7,57	-0,879
DBA-24/O	320,22	56,09	-1,749	DBA-25/S	320	14,23	-1,153
DBA-25/O	304,26	128	-2,107	DBA-28/S	304	4,32	-0,635
DBA-26/O	290,23	63,50	-1,808	DBA-29/S	305	15,12	-1,180
DBA-28/O	288,26	13,34	-1,125	DBA-30/S	319	18,05	-1,256
DBA-30/O	303,27	4,45	-0,648	DBA-32/S	388,50	53,53	-1,729
DBA-32/O	372,74	55,69	-1,746				

NT – não testados por problemas de solubilidade ou por quantidade insuficiente de amostra.

Tabela XXIV. Valores de IC₅₀ controle – *M. tuberculosis*.

Padrão	CIM μg/mL	CIM μmol/L
rifampicina	0,06	0,07

Frente ao padrão rifampicina, os análogos testados não mostraram valores de atividade biológica promissores. Ainda assim, a atividade apresentada pode ser utilizada para os estudos de QSAR desejados, podendo direcionar a síntese de compostos mais ativos.

Construindo-se o mesmo gráfico de distribuição das atividades biológicas como efetuado para as demais endemias, pode-se observar que, também para *M. tuberculosis*, a maioria dos análogos nitrotiofênicos mostrou-se mais potente que os nitrofurânicos (Figura 48).

* compostos que não apresentaram atividade nas concentrações testadas não foram considerados na construção do histograma.

Figura 48. Distribuição das atividades tuberculostáticas apresentada pelos análogos nitrofurânicos e nitrotiofênicos.

5.2.3.4. Doença de Chagas

Os ensaios contra *T. cruzi* foram realizados pelo grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Sérgio Albuquerque, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, SP.

Até o momento, apenas oito compostos foram testados. Os resultados de IC_{50} em $\mu\text{mol/L}$ e suas conversões em $\text{Log } 1/IC_{50}$ são apresentados na Tabela XXV. O valor de IC_{50} obtido para o padrão violeta genciana encontra-se na Tabela XXVI.

Tabela XXV. Atividade contra *T. cruzi* de alguns análogos sintetizados

Amostras	PM	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	$\text{Log } 1/IC_{50}$	Amostras	PM	IC_{50} $\mu\text{mol/L}$	$\text{Log } 1/IC_{50}$
DBA-1/O	259,22	42,69	-1,630	DBA-1/S	275,28	---	---
DBA-2/O	293,66	50,09	-1,700	DBA-2/S	309,73	---	---
DBA-9/O	304,22	18,53	-1,268	DBA-3/S	305,31	16,39	-1,215
				DBA-6/S	291,28	250	-2,398
				DBA-9/S	320,28	---	---

Tabela XXVI Padrão ensaio *T. cruzi*.

Padrão	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)
Violeta genciana	250	76

Estes primeiros análogos testados mostram que os análogos da série exibem promissora atividade antichagásica, quando comparados ao valor obtido para a violeta genciana. Como nos casos anteriores, construíram-se os histogramas de derivados furânicos e tiofênicos para a comparação de suas atividades relativas.

*Estipulou-se 300 como valor para os compostos que não apresentaram atividade apenas para ilustrar o comportamento dos demais análogos quando comparados a estes. Suas IC₅₀, entretanto, não foram determinadas por serem estes compostos ativos em concentrações acima do intervalo testado durante os ensaios.

Figura 49. Distribuição das atividades antichagásicas apresentada pelos análogos nitrofurânicos e nitrotiofênicos.

Diferentemente do observado para as atividades em *P. falciparum*, *L. donovani* e *M. tuberculosis*, os derivados nitrofurânicos mostraram-se mais ativos que os nitrotiofênicos, indicando haver, possivelmente, diferença com relação ao mecanismo de ação dessa classe de compostos no caso de tripanossomas. Estudos a respeito deverão ser efetuados posteriormente para se testar essa hipótese aventada.

5.2.4. Estudos de QSAR

Uma vez obtidos os resultados biológicos apresentados, deu-se início aos estudos de correlações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR).

Para que possam ser aplicados nestes estudos, os dados devem ser tratados. Para tanto, os valores de atividade biológica, medidos em concentração inibitória 50% (IC₅₀) ou concentração inibitória mínima (CIM), foram convertidos em suas respectivas concentrações molares equivalentes e, em seguida, para a escala logarítmica da recíproca desta concentração (Log1/IC₅₀). Estes dados foram apresentados no item 5.2.3, nas respectivas tabelas de atividades biológicas obtidas.

Os estudos de QSAR realizados estão fundamentados em análise clássica, mais especificamente na aplicação da metodologia mista de Hansch-Free Wilson (Free, Wilson, 1964).

Pretende-se compreender a influência dos diferentes substituintes do anel benzênico nas posições *meta* ou *para* nos derivados monossustituídos e *meta* e *para* nos dissustituídos, segundo suas contribuições eletrônicas, hidrofóbicas, estéricas e de polarizabilidade. Para tanto, foram utilizados nestes estudos os seguintes parâmetros físico-químicos:

- × contribuições hidrofóbicas: π_m e π_p
- × contribuições eletrônicas: σ_m e σ_p
- × contribuições estéricas: L_m e L_p
- × polarizabilidade: MR_m e MR_p

Além disto, por meio da utilização de variável indicadora, espera-se compreender a influência do tipo de anel heterocíclico diretamente ligado ao grupo nitro na atividade biológica.

Os estudos foram realizados com auxílio dos programas estatísticos Billin Program® e BuildQSAR®.

Foram obedecidas as regras para derivação de equações termodinâmicas apresentadas na introdução.

5.2.4.1. *Leishmaniose*

Para os estudos de QSAR-2D da atividade antileishmania construiu-se a Tabela XXVII. Esta contém, para cada um dos 49 compostos que exibiram atividade contra *L. donovani*, as características estruturais fundamentais para o estudo, como os substituintes nas posições *meta* e *para* do anel benzênico e o tipo de anel heterocíclico da estrutura. Fornece, também, os valores numéricos das contribuições de cada substituinte, segundo o parâmetro selecionado para o estudo, o valor da variável indicadora – por convenção, $I = 0$ para o núcleo furânico, e $I = 1$, para o núcleo tiofênico -- além dos valores de atividade biológica sob a forma de $\text{Log } 1/IC_{50}$.

Nos estudos que seguem, utilizaram-se valores separados de π para substituintes em *para* e em *meta*. Entretanto, a soma das duas constantes também foi previamente utilizada, mas não acarretou alterações significativas para os estudos aqui apresentados. Preferiu-se, assim, apresentar os resultados com as contribuições individuais de cada substituinte.

Tabela XXVII. Tabela para análise de QSAR – Leishmaniose

$X = O \text{ ou } S$														
	Composto	R_m'	R_p'	Anel	π_m	π_p	σ_m	σ_p	MR_m	MR_p	L_m	L_p	I	Log 1/C
1	DBA-1/O	H	H	O	0	0	0	0	0,103	0,103	2,06	2,06	0	-1,049
2	DBA-2/O	H	Cl	O	0	0,71	0	0,23	0,103	0,603	2,06	3,52	0	-0,894
3	DBA-3/O	H	OMe	O	0	-0,02	0	-0,27	0,103	0,787	2,06	3,98	0	-0,954
4	DBA-5/O	H	NH ₂	O	0	-1,23	0	-0,66	0,103	0,542	2,06	2,93	0	-0,425
5	DBA-6/O	H	OH	O	0	-0,67	0	-0,37	0,103	0,285	2,06	2,74	0	-0,380
6	DBA-7/O	H	Me	O	0	0,56	0	-0,17	0,103	0,565	2,06	3,00	0	-1,041
7	DBA-8/O	H	CF ₃	O	0	0,88	0	0,54	0,103	0,502	2,06	3,30	0	-0,948
8	DBA-9/O	H	NO ₂	O	0	-0,28	0	0,78	0,103	0,736	2,06	3,44	0	-0,818
9	DBA-10/O	Cl	H	O	0,71	0	0,37	0	0,603	0,103	3,52	2,06	0	-0,894
10	DBA-11/O	OMe	H	O	-0,02	0	0,12	0	0,787	0,103	3,98	2,06	0	-1,016
11	DBA-12/O	NMe ₂	H	O	0,18	0	-0,15	0	1,555	0,103	3,53	2,06	0	-0,900
12	DBA-14/O	OH	H	O	-0,67	0	0,12	0	0,285	0,103	2,74	2,06	0	-1,007
13	DBA-15/O	Me	H	O	0,56	0	-0,07	0	0,565	0,103	3,00	2,06	0	-1,296
14	DBA-16/O	CF ₃	H	O	0,88	0	0,43	0	0,502	0,103	3,30	2,06	0	-1,017
15	DBA-17/O	NO ₂	H	O	-0,28	0	0,71	0	0,736	0,103	3,44	2,06	0	-0,994
16	DBA-18/O	Cl	Cl	O	0,71	0,71	0,37	0,23	0,603	0,603	3,52	3,52	0	-0,224
17	DBA-19/O	F	F	O	0,14	0,14	0,34	0,06	0,092	0,092	2,65	2,65	0	-0,977
18	DBA-22/O	Cl	F	O	0,71	0,14	0,37	0,06	0,603	0,092	3,52	2,65	0	-0,807
19	DBA-23/O	OMe	NO ₂	O	-0,02	-0,28	0,12	0,78	0,787	0,736	3,98	3,44	0	-0,869
20	DBA-24/O	OH	NO ₂	O	-0,67	-0,28	0,12	0,78	0,285	0,736	2,74	3,44	0	-0,996
21	DBA-25/O	NH ₂	OMe	O	-1,23	-0,02	-0,16	-0,27	0,542	0,787	2,93	3,98	0	-1,216
22	DBA-26/O	NH ₂	OH	O	-1,23	-0,67	-0,16	-0,37	0,542	0,285	2,93	2,74	0	-1,431
23	DBA-28/O	NH ₂	Me	O	-1,23	0,56	-0,16	-0,17	0,542	0,565	2,93	3,00	0	0,205
24	DBA-30/O	OMe	Me	O	-0,02	0,56	0,12	-0,17	0,787	0,565	3,98	3,00	0	-0,950
25	DBA-32/O	SO ₂ NH ₂	Cl	O	-1,82	0,71	0,46	0,23	1,228	0,603	3,82	3,52	0	-1,585
26	DBA-1/S	H	H	S	0	0	0	0	0,103	0,103	2,06	2,06	1	-0,815
27	DBA-2/S	Cl	H	S	0	0,71	0	0,23	0,103	0,603	2,06	3,52	1	-0,100
28	DBA-3/S	OMe	H	S	0	-0,02	0	-0,27	0,103	0,787	2,06	3,98	1	-0,858
29	DBA-5/S	NH ₂	H	S	0	-1,23	0	-0,66	0,103	0,542	2,06	2,93	1	-0,350
30	DBA-6/S	OH	H	S	0	-0,67	0	-0,37	0,103	0,285	2,06	2,74	1	0,049
31	DBA-7/S	Me	H	S	0	0,56	0	-0,17	0,103	0,565	2,06	3,00	1	-0,653
32	DBA-8/S	CF ₃	H	S	0	0,88	0	0,54	0,103	0,502	2,06	3,30	1	0,088
33	DBA-9/S	NO ₂	H	S	0	-0,28	0	0,78	0,103	0,736	2,06	3,44	1	-0,449
34	DBA-10/S	H	Cl	S	0,71	0	0,37	0	0,603	0,103	3,52	2,06	1	-0,438
35	DBA-11/S	H	OMe	S	-0,02	0	0,12	0	0,787	0,103	3,98	2,06	1	-0,930
36	DBA-14/S	H	OH	S	-0,67	0	0,12	0	0,285	0,103	2,74	2,06	1	-0,439

Tabela XXVII. Tabela para análise de QSAR – Leishmaniose (continuação)

X = O ou S

	Composto	R_p^*	R_m^*	Anel	π_m	π_p	σ_m	σ_p	MR_m	MR_p	L_m	L_p	I	Log 1/C
26	DBA-1/S	H	H	S	0	0	0	0	0,103	0,103	2,06	2,06	1	-0,815
27	DBA-2/S	Cl	H	S	0	0,71	0	0,23	0,103	0,603	2,06	3,52	1	-0,100
28	DBA-3/S	OMe	H	S	0	-0,02	0	-0,27	0,103	0,787	2,06	3,98	1	-0,858
29	DBA-5/S	NH ₂	H	S	0	-1,23	0	-0,66	0,103	0,542	2,06	2,93	1	-0,350
30	DBA-6/S	OH	H	S	0	-0,67	0	-0,37	0,103	0,285	2,06	2,74	1	0,049
31	DBA-7/S	Me	H	S	0	0,56	0	-0,17	0,103	0,565	2,06	3,00	1	-0,653
32	DBA-8/S	CF ₃	H	S	0	0,88	0	0,54	0,103	0,502	2,06	3,30	1	0,088
33	DBA-9/S	NO ₂	H	S	0	-0,28	0	0,78	0,103	0,736	2,06	3,44	1	-0,449
34	DBA-10/S	H	Cl	S	0,71	0	0,37	0	0,603	0,103	3,52	2,06	1	-0,438
35	DBA-11/S	H	OMe	S	-0,02	0	0,12	0	0,787	0,103	3,98	2,06	1	-0,930
36	DBA-14/S	H	OH	S	-0,67	0	0,12	0	0,285	0,103	2,74	2,06	1	-0,439
37	DBA-15/S	H	Me	S	0,56	0	-0,07	0	0,565	0,103	3,00	2,06	1	-0,685
38	DBA-16/S	H	CF ₃	S	0,88	0	0,43	0	0,502	0,103	3,30	2,06	1	-0,578
39	DBA-17/S	H	NO ₂	S	-0,28	0	0,71	0	0,736	0,103	3,44	2,06	1	-0,444
40	DBA-18/S	Cl	Cl	S	0,71	0,71	0,37	0,23	0,603	0,603	3,52	3,52	1	0,390
41	DBA-19/S	F	F	S	0,14	0,14	0,34	0,06	0,092	0,092	2,65	2,65	1	-0,333
42	DBA-22/S	F	Cl	S	0,71	0,14	0,37	0,06	0,603	0,092	3,52	2,65	1	-0,284
43	DBA-23/S	NO ₂	OMe	S	-0,02	-0,28	0,12	0,78	0,787	0,736	3,98	3,44	1	-0,301
44	DBA-24/S	NO ₂	OH	S	-0,67	-0,28	0,12	0,78	0,285	0,736	2,74	3,44	1	-0,736
45	DBA-25/S	OMe	NH ₂	S	-1,23	-0,02	-0,16	-0,27	0,542	0,787	2,93	3,98	1	-0,671
46	DBA-28/S	Me	NH ₂	S	-1,23	0,56	-0,16	-0,17	0,542	0,565	2,93	3,00	1	-0,350
47	DBA-29/S	Me	OH	S	-0,67	0,56	0,12	-0,17	0,285	0,565	2,74	3,00	1	-0,361
48	DBA-30/S	Me	OMe	S	-0,02	0,56	0,12	-0,17	0,787	0,565	3,98	3,00	1	-0,341
49	DBA-32/S	Cl	SO ₂ NH ₂	S	-1,82	0,71	0,46	0,23	1,228	0,603	3,82	3,52	1	-0,906

* sendo $R_m = R_2$ e $R_p = R_1$; C = IC₅₀.

Foram calculados, também, os valores aproximados de pKa para os grupos ionizáveis ligados ao anel aromático dos compostos da biblioteca para estimar seu grau de ionização em pH fisiológico no qual estes foram testados. Entretanto, estes valores não foram utilizados como parâmetros nos estudos de QSAR-2D por serem valores estimados e não experimentais, de maior confiabilidade. A Tabela XXVIII mostra os derivados que possuem grupos ionizáveis, os valores de pKa e a espécie dominante em pH 7,4.

Tabela XXVIII. Valores de pKa estimados para os compostos da biblioteca.

	Composto	R_m^+	R_p^+	pKa	Espécie dominante em pH 7,4
1	DBA-4	H	N(Me) ₂	3,98	N(CH ₃) ₂
2	DBA-5	H	NH ₂	3,68	PhNH ₂
3	DBA-6	H	OH	9,23	PhOH
4	DBA-12	NMe ₂	H	4,08	N(CH ₃) ₂
5	DBA-14	OH	H	9,29	PhOH
6	DBA-24	OH	NO ₂	6,17	PhO ⁻
7	DBA-25	NH ₂	OMe	3,76	PhNH ₂
8	DBA-26	NH ₂	OH	NH ₂ = 4,02 OH = 9,16	PhNH ₂ PhOH
9	DBA-28	NH ₂	Me	3,47	PhNH ₂
10	DBA-29	OH	Me	9,58	PhOH
11	DBA-32	SO ₂ NH ₂	Cl	9,18	SO ₂ NH ₂

Os valores da tabela XXVIII foram calculados utilizando-se o programa Pallas 3.0[®] (CompuDrug Chemistry Ltd) e são atribuídos aos substituintes passíveis de ionização. Não há alterações significativas nos pKa dos diferentes substituintes com a variação do anel heteroaromático diretamente ligado ao grupo nitro.

Com base nestes resultados teóricos pode-se prever que os compostos DBA-24/O e o DBA-24/S são os únicos da biblioteca a se apresentarem ionizados em pH fisiológico. Estando sob a forma ionizada, o transporte destes análogos através da membrana plasmática dos parasitos é prejudicado e os valores da resposta biológica não representam, desta forma, as reais concentrações inibitórias 50%. Excluíram-se, então, estes análogos dos estudos a seguir apresentados.

Num primeiro momento, foram utilizados 47 dos 49 compostos da biblioteca na obtenção de equações de QSAR-2D. Conseqüentemente, o número de descritores utilizado nas equações poderia chegar até nove (**uma** variável para cada **cinco** dados de atividade biológica). Assim, todos os oito parâmetros escolhidos para o estudo poderiam ser associados na busca da melhor equação.

Por meio do uso do software BuildQSAR[®], obteve-se a seguinte matriz de correlação cruzada entre os descritores escolhidos (Tabela XXIX).

Os valores destacados correspondem às variáveis cuja correlação é alta e estas não devem ser combinadas na mesma equação, visto que os parâmetros escolhidos para se obter equações válidas de QSAR devem ser essencialmente independentes.

Tabela XXIX. Matriz de correlação cruzada entre as variáveis

	π_m	π_p	σ_m	σ_p	MR_m	MR_p	L_m	L_p	I
π_m	1	0,013	0,054	0,017	0,044	0,143	0,000	0,123	0,000
π_p		1	0,026	0,129	0,031	0,029	0,031	0,054	0,003
σ_m			1	0,035	0,100	0,138	0,243	0,080	0,003
σ_p				1	0,015	0,029	0,030	0,034	0,000
MR_m					1	0,014	0,757	0,022	0,007
MR_p						1	0,041	0,873	0,002
L_m							1	0,047	0,001
L_p								1	0,001
I									1

Estas altas correlações entre os parâmetros destacados na Tabela XXIX limitam o número máximo a ser combinado. Equações considerando simultaneamente L_m e MR_m ou L_p e MR_p como descritores não foram utilizadas.

Também, é necessário selecionar quais variáveis farão parte dos modelos estudados. O *software* BuildQSAR[®] permite selecionar tais variáveis de forma a se obter os modelos estatísticos mais significativos. Para tanto, pode-se optar pela seleção de variáveis pela metodologia sistemática ou utilizando-se algoritmo genético.

A busca sistemática, escolhida para estas análises, é dividida por número de componentes ou variáveis no modelo. Definido este número, devem-se estabelecer os seguintes critérios:

- ✕ coeficiente de correlação mínimo esperado para os modelos propostos;
- ✕ coeficiente de intercorrelação máximo entre as variáveis.

Variou-se, de um a cinco, o número de variáveis no modelo. Utilizaram-se como limites coeficiente de correlação do modelo maior que 0,6 e coeficientes de intercorrelação entre as variáveis menores que 0,7. Estes valores foram escolhidos após serem testadas diferentes combinações destes limites. Modelos com coeficientes de correlação maiores ou iguais a 0,7 não foram encontrados. Modelos contendo uma única variável só foram obtidos com coeficiente de correlação mínimo de 0,5.

Estes valores de coeficiente de correlação não produziram boas equações, mas por se tratar de estimativa prosseguiu-se com os estudos aplicando-se análise de regressão em busca de modelos significativos.

A Tabela XXX lista os 11 melhores resultados da busca dentro dos limites estabelecidos, sendo o décimo primeiro resultado, o modelo sugerido para uma única variável.

Tabela XXX. Busca sistemática de variáveis

	Variáveis					Estatística			
	Var-01	Var-02	Var-03	Var-04	Var-05	N	R	S	F
1	π_m	π_p	σ_m	MR_m	I	47	0,647	0,384	5,892
2	π_m	π_p	MR_m	MR_p	I	47	0,646	0,384	5,871
3	π_m	π_p	MR_m	L_p	I	47	0,644	0,385	5,813
4	π_m	π_p	MR_m	I	---	47	0,644	0,380	7,424
5	π_m	MR_m	MR_p	I	---	47	0,643	0,381	7,406
6	π_m	σ_m	MR_m	I	---	47	0,642	0,381	7,351
7	π_m	MR_m	L_p	I	---	47	0,641	0,381	7,324
8	π_m	MR_m	I	---	---	47	0,640	0,378	9,923
9	π_m	L_p	I	---	---	47	0,637	0,379	9,778
10	MR_m	I	---	---	---	47	0,621	0,381	13,811
11	I	---	---	---	---	47	0,577	0,392	22,414

Vale ressaltar que dentro dos limites estabelecidos, maior número de resultados de seleção de variáveis é obtido para os grupos contendo três, quatro e cinco parâmetros no modelo. Aqui são apresentados apenas os resultados com os coeficientes de correlação mais altos, embora seus intervalos de confiança, dados pelos valores de F, cobrissem área de 95% de significância.

A construção de modelos com quatro ou cinco componentes, embora possível e apresentando coeficientes de correlação mais altos que os demais obtidos, levou a equações de baixa significância estatística, informação dada pelos testes de validação cruzada (covariância – q^2) e pelos grandes intervalos de confiança dos coeficientes obtidos na análise de regressão. Estes valores são destacados em negrito na Figura 50. Esta figura mostra exemplos de equações obtidas utilizando-se as combinações de variáveis da linha 1 da Tabela XXX aplicando-se os modelos linear e parabólico. Estes modelos não se mostraram significativos também utilizando-se o modelo bilinear.

Modelo linear com 5 variáveis

$$AB = +0,14381(\pm 0,11563) \pi_m - 0,07030(\pm \mathbf{0,15353}) \pi_p + 0,02485(\pm \mathbf{0,37608}) \sigma_m - 0,13970(\pm 0,11578) L_m + 0,57163(\pm 0,14621) I - 0,55815(\pm 0,331486)$$

$$(n=42; \mathbf{r=0,827}; s=0,230; F=15,566; \mathbf{Q^2=0,096}; S_{PRESS}=0,389)$$

outliers = 18/O; 28/O; 1/S; 3/S e 18/S

Modelo parabólico com 5 variáveis

$$AB = -0,18728(\pm 0,091426) \pi_m^2 - 0,00317(\pm \mathbf{0,10494}) \pi_m + 0,05339(\pm \mathbf{0,11665}) \pi_p + 0,05489(\pm \mathbf{0,23898}) \sigma_m + 0,01962(\pm \mathbf{0,08180}) L_m + 0,59845(\pm 0,09542) I - 1,02131(\pm 0,234696)$$

$$(n=37; \mathbf{r=0,931}; s=0,141; F=32,557; (\pi_m)\text{-ótimo} = +0,008; \mathbf{Q^2=0,801}; S_{PRESS}=0,172)$$

outliers = 5/O; 6/O; 18/O; 28/O; 1/S; 3/S; 6/S; 8/S; 11/S e 18/S

Figura 50. Exemplo de modelos de 5 componentes.

Além disto, pelas regras expostas na introdução para a derivação de modelos significativos de QSAR, devem-se escolher sempre os modelos mais simples. Assim, os esforços foram concentrados na obtenção de modelos com três ou menos variáveis.

Todas as demais combinações de variáveis sugeridas pelo programa foram testadas, mas ainda assim nenhum modelo satisfatório do ponto de vista estatístico foi obtido. Alguns problemas principais destacaram-se destes estudos:

- ✖ o número de *outliers*, isto é, dados que não se encaixam no conjunto e devem ser removidos para a obtenção de equações significativas, foi muito grande (cerca de 10 pontos);
- ✖ estes *outliers* muitas vezes englobavam dados referentes às melhores atividades obtidas. Assim sendo, ao desconsiderá-los, estaríamos eliminando os compostos mais ativos da série, o que não é racional;
- ✖ a variável indicadora I foi o único parâmetro a se manter sempre significativo ao longo dos diferentes modelos obtidos, estando presente em TODAS as combinações de variáveis sugeridas pela busca sistemática.

A importância da variável indicadora, ou seja, do tipo de anel diretamente ligado ao grupo nitro, já havia sido observada pela distribuição prévia dos dados biológicos em histograma. Este efeito é confirmado pelo modelo 11 da Tabela XXX, no qual a variável indicadora é a de escolha para a melhor equação contendo um único componente, ainda que apresentando coeficiente de correlação baixo.

Em razão deste efeito diferenciado da variável indicadora sobre os modelos, acredita-se que a presença da mesma na análise pode mascarar efeitos mais sutis como os eletrônicos ou hidrofóbicos devido às substituições no anel benzênico das estruturas.

Visando confirmar esta proposta, os dados foram divididos segundo o tipo de anel heterocíclico ligado ao grupo nitro (Figura 51a). Assim, passou-se a trabalhar com os grupos dos compostos “Nitrofurânicos” (**O**) e “Nitrotiofênicos” (**S**).

Uma subdivisão destes grupos de dados segundo o grau de substituição (Figura 51b) também foi realizada, porém os estudos de QSAR-2D para estes subgrupos não mostraram diferenças significativas com relação aos estudos dos grupos para a primeira divisão.

Figura 51. Divisão da biblioteca dos compostos testados contra *L. donovani*.

Os grupos *nitrofurânicos* e *nitrotiofênicos* foram analisados seguindo os mesmos procedimentos aplicados para o estudo da biblioteca completa.

5.2.4.1.1. Nitrofurânicos

O grupo dos *nitrofurânicos* é composto por 24 análogos. Para estes, até cinco variáveis independentes podem ser utilizadas para descrever a atividade biológica em termos de propriedades físico-químicas, com base na regra de **uma** variável para cada **cinco** dados de atividade biológica.

Deve-se selecionar, portanto, dentre os oito parâmetros escolhidos para os estudos de QSAR, quais devem ser utilizados para descrever a atividade deste subgrupo. A matriz de correlação cruzada entre os descritores obtidas com auxílio do programa BuildQSAR® para os *nitrofurânicos* é mostrada na Tabela XXXI.

Tabela XXXI. Matriz de correlação cruzada entre as variáveis: *nitrofurânicos*

	π_m	π_p	σ_m	σ_p	MR_m	MR_p	L_m	L_p
π_m	1	0,002	0,063	0,025	0,031	0,123	0,000	0,114
π_p		1	0,039	0,160	0,023	0,028	0,030	0,053
σ_m			1	0,045	0,041	0,102	0,204	0,055
σ_p				1	0,009	0,035	0,028	0,035
MR_m					1	0,028	0,702	0,042
MR_p						1	0,046	0,878
L_m							1	0,054
L_p								1

Novamente, os valores em destaque correspondem à alta correlação entre variáveis, informando que modelos que combinem L_p e MR_p ou L_m e MR_m na descrição da atividade biológica devem ser desconsiderados.

Para a busca sistemática de variáveis variou-se o número de componentes no modelo de um a cinco. Entretanto não foi possível encontrar modelos com coeficientes de correlação maiores que 0,3, o que indica a ausência de correlação da atividade biológica destes compostos com os parâmetros escolhidos neste estudo para descrevê-la.

Neste caso a busca por modelos, lineares ou não-lineares, não levaria à melhora dos valores de correlação ou à obtenção de modelos satisfatórios ou coerentes.

Este resultado sugere a importância acentuada do tipo de anel diretamente ligado ao grupo nitro, dado nestes estudos pela variável indicadora, e que, quando removida, levou à ausência de correlação nos termos estabelecidos para estes estudos.

5.2.4.1.2. *Nitrotiofênicos*

O grupo dos *nitrotiofênicos* é composto por 23 análogos. Empregando a regra de seleção de número de variáveis, até 4 variáveis independentes podem ser combinadas para descrever a atividade biológica destes compostos em termos de propriedades físico-químicas.

Os estudos de QSAR-2D feitos para este grupo seguiram os mesmos critérios aplicados para seus análogos *nitrofurânicos*.

A matriz de correlação cruzada entre as variáveis para este grupo segue na Tabela XXXII.

Tabela XXXII. Matriz de correlação cruzada entre as variáveis: *nitrotiofênicos*

	π_m	π_p	σ_m	σ_p	L_m	L_p	MR_m	MR_p
π_m	1	0,039	0,044	0,010	0,005	0,108	0,005	0,165
π_p		1	0,013	0,100	0,042	0,042	0,002	0,030
σ_m			1	0,025	0,073	0,148	0,228	0,199
σ_p				1	0,011	0,012	0,000	0,021
L_m					1	0,141	0,276	0,088
L_p						1	0,545	0,791
MR_m							1	0,317
MR_p								1

Para este subgrupo, modelos que combinem as variáveis L_p e MR_p foram desconsiderados.

A seleção de variáveis também foi realizada por busca sistemática e os limites estabelecidos foram coeficiente de correlação mínimo de 0,5 e coeficiente de intercorrelação máximo de 0,7. Para o modelo descrito por uma única variável o limite de coeficiente de correlação foi de 0,3. Como no caso dos análogos *nitrofurânicos*, estes limites são baixos, mas foram aceitos para que fosse possível obter a busca das melhores variáveis.

O número de componentes do modelo variou de um a quatro. Os 6 melhores resultados da busca estão listados na Tabela XXXIII.

Tabela XXXIII. Busca sistemática de variáveis para *nitrotiofênicos*

	Variáveis					Estatística			
	Var-01	Var-02	Var-03	Var-04	Var-05	N	R	S	F
1	π_m	π_p	σ_m	L_p	---	23	0,537	0,305	1,819
2	π_m	π_p	L_m	L_p	---	23	0,529	0,307	1,748
3	π_m	π_p	σ_p	L_p	---	23	0,529	0,307	1,753
4	π_m	π_p	L_p	---	---	23	0,526	0,299	2,423
5	π_m	σ_m	L_p	---	---	23	0,521	0,300	2,365
6	π_m	L_p	---	---	---	23	0,503	0,297	3,382
7	π_m	---	---	---	---	23	0,307	0,319	2,182

Como para o subgrupo *nitrofurânicos*, não foi possível obter modelos significativos.

5.2.4.2. Malária, Tuberculose e Doença de Chagas

Para estas doenças, aplicou-se a mesma sistemática anteriormente descrita para leishmaniose e, de forma similar, não foi possível obter modelos confiáveis. Também nestes estudos foi realizada a subdivisão da biblioteca em *nitrofurânicos* e *nitrotiofênicos* visto que a variável indicadora parecia mascarar o efeito das substituições no anel benzênico da estrutura.

Mais uma vez, os estudos não revelaram qualquer correlação com os parâmetros escolhidos para representar as contribuições eletrônicas, hidrofóbicas e mesmo estéricas dos substituintes utilizados.

Como no caso dos estudos para os dados de atividade antileishmania, a variável indicadora parece ser o único parâmetro relevante para a atividade biológica dos compostos, o que corrobora as conclusões preliminares obtidas pela análise dos histogramas apresentados neste texto.

No caso da doença de Chagas, em particular, os ensaios englobando todos os análogos da biblioteca não foram efetuados até o momento, não podendo ser, assim, realizados os estudos de QSAR-2D.

Há que se considerar, ainda, a variabilidade dos valores das triplicatas das atividades antiparasitárias observada em todos os ensaios, principalmente no caso da atividade antimalárica.

Embora os ensaios contra parasitos como *P. falciparum* e *L. donovani* estejam bem estabelecidos nos laboratórios nos quais os ensaios biológicos foram realizados, há dificuldade em se obter alta reprodutibilidade em ensaios *in vitro* em cultura de parasitos. Muitas vezes os ensaios biológicos envolvendo parasitos expressam seus resultados sem valores de desvio padrão, mesmo que o artigo informe que os ensaios tenham sido realizados em duplicatas, triplicatas e até mesmo quadruplicatas (Delmas *et. al.*, 1993; Tedlaouti *et. al.*, 1991).

Para ensaios frente a *Trichomonas vaginalis*, Barthi e colaboradores (2002) reportam valores de desvios padrões de até 70% em relação ao valor absoluto de atividade de um dado composto.

No caso de *P. falciparum* a situação é ainda mais grave, pois estes possuem etapa sexuada em seu ciclo e, dessa forma, alta variabilidade.

5.2.5. Discussões dos ensaios de QSAR-2D

5.2.5.1. *Modificações de substituintes no anel benzênico da estrutura*

Ao término dos estudos realizados, não foi possível obter modelo adequado que descrevesse qualquer correlação entre as atividades biológicas obtidas e as contribuições físico-químicas dos diferentes substituintes escolhidos para estes estudos.

Algumas hipóteses foram levantadas no decorrer dos estudos para explicar a possível falta de correlação entre as modificações estruturais no anel benzênico e as atividades biológicas estudadas e encontram-se como segue:

1. A escolha dos substituintes para os estudos de QSAR-2D pode não ter sido adequada. A faixa de variação das contribuições poderia ter sido mais ampla. De fato, a faixa estreita utilizada atendia à preocupação inicial, nos estudos de Topliss efetuados, de se identificar quais propriedades físico-químicas predominavam na atividade tuberculostática, ponto de partida para o desenvolvimento do trabalho com as demais atividades. Os resultados obtidos neste estudo sugeriam que a ampla diferença entre as contribuições dos substituintes poderia ter sido a razão da dificuldade em se identificar os parâmetros de maior influência.
2. Como já discutido anteriormente, a relativa alta variabilidade das triplicatas nos ensaios biológicos frente a parasitos pode levar a estudos de QSAR-2D não confiáveis.
3. As variações no anel aromático não afetam consideravelmente o potencial de redução do grupo nitro, mesmo que estas ocorram na posição 2 do anel nitro-heterocíclico e por meio de cadeia completamente conjugada, como no caso em questão.
4. A carbonila da estrutura dos análogos poderia atuar bloqueando a ressonância que, num primeiro momento, se acreditava estar ocorrendo na molécula completa. Assim, modificações estruturais realizadas no anel benzênico, como as alterações de substituintes nas posições *meta* e *para* do anel, não afetariam o potencial de redução do grupo nitro como esperado durante o planejamento da biblioteca.
5. A carbonila competiria com os substituintes do anel benzênico no efeito de deslocalização eletrônica interferindo com o poder aceptor do grupo nitro. Estudos preliminares do comportamento eletroquímico dos análogos¹ mostraram que a carbonila da estrutura atua como grupo retirador de elétrons do sistema como mostrado na Figura 52. O grupo nitro estaria, assim, seria mais facilmente reduzido do que o grupo nitro do análogo benzidrazínico, ou seja, que não possui a carbonila em sua estrutura. A Tabela XXXIV mostra os resultados destes estudos preliminares. Nesta situação, seriam necessárias alterações no anel aromático tais que sobrepujassem o efeito da carbonila da própria estrutura. Poder-se-ia concluir, assim, que os diferentes substituintes sugeridos no planejamento não originariam variações de

¹ Estudos de voltametria realizados pelo Prof. Dr. Mauro Aquiles La Scalea e pelo químico Charles de Lima Brito, ambos do LAPEN, FCF-USP.

contribuições eletrônicas grandes o suficiente para se sobreporem ao efeito da carbonila da estrutura.

Tabela XXXIV. Potencial de pico de formação de hidroxilamina, pH 7,4.

Derivado	E _p (Volts)
-0,450
-0,540

A Figura 52 ilustra as duas primeiras hipóteses sugeridas, que consideram importante o papel da carbonila na ressonância das moléculas.

Figura 52. Possíveis influências da carbonila com relação à ressonância da molécula.

5.2.5.2. Tipo de anel heterocíclico diretamente ligado ao grupo nitro

Está claro que é de grande importância o tipo de anel heterocíclico diretamente ligado ao grupo nitro, uma vez que os derivados nitrotiofênicos, tanto mono quanto dissustituídos, apresentaram-se mais ativos que seus análogos nitrofurânicos em três das quatro atividades biológicas estudadas neste trabalho.

É possível que a melhor atividade dos análogos nitrotiofênicos se deva à extensão da valência do átomo de enxofre em razão de orbitais *d* livres. Estes acomodam mais elétrons do que o octeto permite, e assim apresentam reatividade maior, podendo aceitar os elétrons do grupo nitro. Este, por sua vez, torna-se mais suscetível à redução, à qual se atribui o mecanismo de ação da classe.

5.2.6 Análise qualitativa das relações entre a estrutura e as atividades antileishmania, antimalárica e antimicobacteriana

Em razão de não terem sido obtidos resultados do estudo de QSAR com os compostos sintetizados, decidiu-se proceder a análise qualitativa dos derivados mais ativos de ambas as séries. Os dados encontram-se nas Tabelas XXXV a XXXVII.

Tabela XXXV. Compostos com maior atividade frente a *L. donovani*

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA								
Composto	Substituintes		Propriedades físico-químicas				Atividade (nmol/L)	Comentários
	R ₁	R ₂	π_m	π_p	σ_m	σ_p		
DBA-1/O	H	H	0	0	0	0	11,19	protótipo
DBA-18/O	Cl	Cl	0,71	0,71	0,37	0,23	1,68	~ 7x mais ativo que o protótipo
DBA-28/O	CH ₃	NH ₂	-1,23	0,56	-0,16	-0,17	0,62	~ 18x mais ativo que o protótipo
DBA-1/S	H	H	0	0	0	0	6,54	protótipo
DBA-2/S	Cl	H	0	0,71	0	0,23	1,26	~ 5x mais ativo que o protótipo
DBA-6/S	OH	H	0	-0,67	0	-0,37	0,89	~ 7x mais ativo que o protótipo
DBA-8/S	CF ₃	H	0	0,88	0	0,54	0,82	~ 8x mais ativo que o protótipo
DBA-18/S	Cl	Cl	0,71	0,71	0,37	0,23	0,41	~ 16x mais ativo que o protótipo

Observa-se comportamento diferente dos núcleos frente aos substituintes no anel benzidrazídico, como já evidenciado nos estudos quantitativos. É importante observar que, comparando esses derivados com o padrão pentamidina ($IC_{50} = 1,06$ nmol/L), utilizado no ensaio em *L. donovani*, o DBA-28/O mostrou-se, aproximadamente, 2 vezes mais ativo, o DBA-8/S, 1,3 vezes mais ativo e o DBA-18/S, 3 vezes mais ativo que esse fármaco.

Em se tratando da atividade contra *P. falciparum* (Tabela XXXVI), não há possibilidade de se chegar a conclusão inequívoca sobre tendências na substituição. A variabilidade encontrada na atividade biológica nas triplicatas pode ser a causa desse problema, como anteriormente mencionado.

Ainda assim, é possível visualizar diferenças na atividade biológica por conta das substituições efetuadas com relação aos compostos não substituídos.

Tabela XXXVI. Compostos expressivos quanto a atividade frente *P. falciparum*.

ATIVIDADE ANTIMALÁRICA								
Composto	Substituintes		Propriedades físico-químicas				Atividade ($\mu\text{mol/L}$)	Comentários
	R ₁	R ₂	π_m	π_p	σ_m	σ_p		
DBA-1/O	H	H	0	0	0	0	7,33	protótipo
DBA-4/O	NH ₂	H	0	0,18	0	-0,83	1,75	~ 4x mais ativo que o protótipo
DBA-32/O	Cl	SO ₂ NH ₂	-1,82	0,71	0,46	0,23	1,69	
DBA-1/S	H	H	0	0	0	0	6,90	protótipo
DBA-12/S	H	N(CH ₃) ₂	0,18	0	-0,15	0	1,88	~ 4x mais ativo que o protótipo
DBA-14/S	H	OH	-0,67	0	0,12	0	1,82	
DBA-24/S	OH	NO ₂	-0,67	-0,28	0,12	0,78	1,73	
DBA-28/S	NH ₂	CH ₃	-1,23	0,56	-0,16	-0,17	1,01	~ 7x mais ativo que o protótipo
DBA-29/S	OH	CH ₃	-0,67	0,56	0,12	-0,17	0,92	

Com relação à atividade antimicrobacteriana (Tabela XXXVII), analogamente ao observado com outras atividades, não se pode identificar um padrão de comportamento em ambas as séries.

Também, entretanto, foram identificados compostos cuja atividade biológica foram melhores que a do protótipo não substituído.

Tabela XXXVII. Compostos expressivos quanto à atividade frente *M. tuberculosis*

ATIVIDADE TUBERCULOSTÁTICA								
Composto	Substituintes		Propriedades físico-químicas				Atividade ($\mu\text{mol/L}$)	Comentários
	R ₁	R ₂	π_m	π_p	σ_m	σ_p		
DBA-1/O	H	H	0	0	0	0	46,84	protótipo
DBA-15/O	H	CH ₃	0,56	0	-0,07	0	7,47	~ 4x mais ativo que o protótipo
DBA-19/O	F	F	0,14	0,14	0,34	0,06	5,41	~ 8x mais ativo que o protótipo
DBA-22/O	F	Cl	0,71	0,14	0,37	0,06	7,17	~ 7x mais ativo que o protótipo
DBA-30/O	CH ₃	OCH ₃	-0,02	0,56	0,12	-0,17	4,45	~ 11x mais ativo que o protótipo
DBA-1/S	H	H	0	0	0	0	59,98	
DBA-18/S	Cl	Cl	0,71	0,71	0,37	0,23	3,61	~ 17x mais ativo que o protótipo
DBA-19/S	F	F	0,14	0,14	0,34	0,06	8,33	~ 7x mais ativo que o protótipo
DBA-23/S	OCH ₃	NO ₂	-0,02	-0,28	0,12	0,78	7,42	~ 8x mais ativo que o protótipo
DBA-24/S	OH	NO ₂	-0,67	-0,28	0,12	0,78	7,57	
DBA-28/S	NH ₂	CH ₃	-1,23	0,56	-0,16	-0,17	4,32	~ 14x mais ativo que o protótipo

Estes resultados mostram que as substituições levam a alterações significativas na atividade biológica. No entanto, não se consegue identificar claramente padrão de comportamento dos substituintes em relação à atividade biológica.

5.2.7. Outros estudos preliminares

5.2.7.1. QSAR-2D

Após os resultados obtidos com os programas BilinProgram® e BuildQSAR®, fez-se necessário o aprofundamento dos estudos por meio do emprego de outros programas computacionais, bem como outras abordagens de QSAR.

Assim, utilizou-se o programa Cerius2 (Acellrys®), o qual permite o emprego de maior número de parâmetros, inseridos em sua base de dados, bem como algoritmo genético e tratamentos estatísticos como PLS e PCA para busca de variáveis e construção de modelos.

Além dos parâmetros clássicos, anteriormente citados, diferentes parâmetros físico-químicos foram analisados, como energia de orbitais HOMO e LUMO, capacidade doadora e receptora de ligações de hidrogênio, Sterimol, entre outros.

Embora estes estudos tenham sido preliminares, não foi possível obter modelo significativo destas análises, sendo que os parâmetros clássicos mantiveram a prioridade

sobre os demais parâmetros utilizados. Novamente, a importância da variável indicadora sobrepôs-se às contribuições dos diferentes substituintes do anel benzênico da estrutura.

Indicações sobre a importância de contribuição estérica para atividade não foram obtidas pelos estudos de QSAR-2D por meio da utilização deste programa.

5.4.4.2. QSAR-3D dos derivados com atividade antileishmania

Com vistas a compreender um pouco mais sobre o efeito das modificações estruturais realizadas e como treino para futuras análises 3D destes compostos, foi aplicado o CoMFA – Comparative Molecular Fields Analysis.

Para tanto, construiu-se uma base de dados com 22 dos 51 compostos analisados (*training set*). Estas estruturas foram minimizadas e alinhadas à conformação de menor energia de um dos derivados mais ativos em *L. donovani* da série (DBA-6/S; 0,9 nmol/L).

A tabela XXXVIII apresenta os resultados dos dez melhores modelos de 3D-QSAR construídos para o alinhamento da série.

Tabela XXXVIII. Medidas estatísticas, número de descritores e filtro para os dez melhores modelos do alinhamento obtido

Modelo	número de descritores	q ²	R ²	SEE	F	filtro
1	2	0,459	0,797	0,154	37,399	0
2	2	0,479	0,796	0,154	37,001	1
3	2	0,481	0,822	0,144	43,725	2
4	2	0,540	0,834	0,139	47,747	1,8
5	2	0,531	0,828	0,142	45,696	1,7
6	2	0,537	0,831	0,141	46,631	1,9
Região Focalizada (de 2 Å para 1 Å)						
7	1	0,432	0,687	0,186	43,822	0
8	2	0,432	0,752	0,170	28,795	0
9	2	0,470	0,772	0,163	32,160	2
10	2	0,467	0,773	0,163	32,262	1,8

SEE - *standard estimated error*

Modelos obtidos após a remoção de *outliers* também foram considerados, entretanto, estes não foram significativos.

O modelo 4, destacado em vermelho na tabela XXXVIII, foi o melhor obtido para esta série. A representação gráfica deste modelo é mostrada na Figura 53, que segue.

$$R^2 = 0,834, q^2 = 0,540, SEE = 0,139, F = 47,747$$

Figura 53. CoMFA para a série dos primeiros 29 derivados analisados.

Este modelo confirma a importância do tipo de anel para a atividade biológica apresentada pelos compostos: grupos volumosos próximos ao grupo nitro favorecem a atividade antileishmania. Nestes derivados, o volume é dado pelo átomo de enxofre, que, comparado ao oxigênio, possui maior raio atômico.

Com relação aos substituintes do anel benzênico, o modelo informa que grupos retiradores de elétrons localizados em *para* no anel benzênico (região representada em vermelho no CoMFA) favorecem a atividade antileishmania. Já substituintes em *meta* devem ser pequenos e doadores de elétrons (região representada em azul e amarelo). Entretanto, a interpretação mais provável do modelo é de que substituições em *meta* não são interessantes para a eficácia biológica dos compostos.

A Figura 54 mostra a representação gráfica do modelo 4 para o composto DBA-6/S.

Figura 54. CoMFA para o composto DBA-6/S, um dos mais ativos da série.

Tanto os resultados dos estudos em 2D quanto os em 3D mostraram que o tipo de anel heterocíclico ligado diretamente ao grupo nitro é a característica mais importante para a atividade biológica dos derivados.

Nos dois tipos de estudos também não foi possível a elucidação do papel das substituições no anel benzênico sob a atividade das moléculas e as contribuições hidrofóbicas parecem ter maior importância que as eletrônicas e estéricas ainda em termos de substituição no anel benzênico.

VI. CONCLUSÕES

6.1 Mediante a aplicação de metodologia de Topliss, 6 nitroderivados monossustituídos foram inicialmente sintetizados, sendo a 5-nitro-2-tiofilideno-4-metoxibenzidrazida o análogo mais ativo da série;

6.2 Obtiveram-se, por meio de síntese paralela, 56 compostos nitro-heterocíclicos benzidrazídicos, sendo 32 monossustituídos e 24 dissustituídos. Desses, 28 correspondem a derivados nitrofurânicos e 28 a tiofênicos;

6.3 O estudo preliminar utilizando a metodologia de Topliss foi de grande valia na elaboração da biblioteca sintetizada, visto que direcionou a escolha dos substituintes utilizados. Também estes estudos abrem campo para exploração de tais estruturas na busca de novos fármacos tuberculostáticos.

6.4 O emprego da síntese paralela foi de grande auxílio e sucesso para a obtenção de número considerável de compostos disponíveis para o ensaio biológico. A metodologia sintética aplicada foi adequada ao emprego da síntese paralela, bem como para as etapas de purificação e análise dos compostos;

6.5 Não foi possível obter modelos estatisticamente satisfatórios para explicar as influências das diferentes substituições no anel benzênico da estrutura. Hipóteses aventadas para explicar a falta de correlação merecem serem testadas posteriormente.

6.6 O estudo de Hansch-Free-Wilson evidenciou a importância significativa do tipo de anel heterocíclico diretamente ligado ao grupo nitro, podendo este ser um dos pontos explorados para modificações moleculares posteriores.

6.7 Os derivados nitrotiofênicos mostraram-se mais ativos que os nitrofurânicos em todos os ensaios biológicos, à exceção do teste de atividade tripanomicida.

6.8 Embora não tenha sido possível, até o momento, encontrar modelos completamente satisfatórios para descrever a atividade antiparasitária e antimicobacteriana dos análogos sintetizados, estes compostos podem originar candidatos interessantes à quimioterapia contra as doenças envolvidas. Alguns derivados mostraram maior atividade que

o protótipo, quando ensaiados em culturas de plasmódios, tripanossomas, micobactérias e, especialmente, leishmanias.

VII. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados apresentados neste trabalho, abrem-se as perspectivas arroladas a seguir, com o intuito de responder aos vários questionamentos deles decorrentes.

1. Estudos de CoMFA e CoMSiA para averiguar possíveis contribuições estéricas para as atividades avaliadas;
2. Síntese e estudos eletroquímicos das séries benzidrazídicas e benzidrazínicas com a finalidade de se testar as hipóteses aventadas acerca da participação da carbonila na deslocalização eletrônica na molécula e em especial seus efeitos sobre o grupo nitro;
3. Explorar outros tipos de anéis nitro-heterocíclicos e aprofundar os estudos sobre os efeitos do heteroátomo na capacidade redutora do grupo nitro.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUD-ZEID, C.; GARBE, T.; LATHIGRA, R.; WIKER, H.G.; HARBOE, M.; ROOK, G.A.; YOUNG, D.B. Genetic and immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding proteins. *Infect. Immun.*, Washington, v. 59, p. 2712-2718, 1991.
- ALBRECHT, H. Leishmaniasis - new perspectives on an underappreciated opportunistic infection. *AIDS*, Philadelphia, v. 12, p. 2225-2226, 1998.
- AMIN, N.M. Let's stop the comeback of tuberculosis - Best drug regimens for prevention and treatment. *Postgrad. Med.*, Minneapolis, v. 88, n. 6, p. 107-14, 117-19, 122, 124, 1990.
- ANDRADE, S.G.; CARNEIRO FILHO, A.; DE SOUZA, A.J.; DE LIMA, E.S.; ANDRADE, Z.A. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Exp. Pathol.*, Oxford, v. 78, p. 391-399, 1997.
- ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; ZICKER, F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Em. Infec. Dis.*, Atlanta, v. 2, n. 2, p. 1-4, 1996.
- ARMSTRONG, J.A.; HART, P.D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J. Exp. Med.*, New York, v. 134, p. 713-740, 1971.
- ARNOT, D.E.; GULL, K. The *Plasmodium* cell-cycle: facts and questions. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Liverpool, v. 92, 361-365, 1998.
- ATHERTON, E.; SHEPPARD, R.C. *Solid phase peptide synthesis: a practical approach*; Oxford University: Oxford, 1989.
- BALKENHOHL, F.; BUSSCHE-HÜNNFELD, C.; LANSKY, A.; ZECHEL, C. Combinatorial synthesis of small organic molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; New York, v. 35, p. 2288-2337, 1996.
- BANNISTER L.H.; BUTCHER G.A.; DENNIS E.D.; MITCHELL, G.H. Structure and invasive behaviour of *Plasmodium knowlesi* merozoites *in vitro*, *Parasitology*, Amsterdam, v. 71, p.483-491, 1975.
- BANNISTER, L.H.; HOPKINS, J.M.; FOWLER, R.E.; KRISHNA, S.; MITCHELL, G.H. A Brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol. Today*, Amsterdam, v. 16, n. 10, 427-433, 2000.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer Experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2ª ed., 2002.
- BARRY, C.E. New horizons in the treatment of tuberculosis. *Biochem. Pharmacol.*, Amsterdam, v.54, p. 1165-1172, 1997.

- BECUWE, P.; GRATEPANCHE, S.; FOURMAUX, M. N.; VAN BEEUMEN, J.; SAMYN, B.; MERCEREAU-PUJALON, O.; TOUZEL, J. P.; SLOMIANNY, G.; CAMUS, D.; DIVE, D. Characterization of iron-dependent endogenous superoxide dismutase of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.76, 125-134, 1996.
- BEHBEHANI K. Developmental cycles of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas 1909) in mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *Parasitology*, Amsterdam, v. 66, p. 343- 353, 1973.
- BEN SALAH, A.B.; BEN ISMAIL, R.; AMRI, F.; CHLIF, S.; BEN RZIG, F.; KHARRAT, H.; HADHRI, H.; HASSOUNA, M.; DELLAGI, K. Investigation of the spread of human visceral leishmaniasis in central Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 94, p. 382-386, 2000.
- BERMAN, J. D. Biochemistry of Pentostan resistant *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 40, p. 159-164, 1989.
- BESRA, G.S.; BRENNAN, P. The mycobacterial cell envelope: a target for novel drugs against tuberculosis. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 49, suppl.1, p. 25-30, 1997.
- BHARTI, N.; HUSAIN, K.; GONZALEZ GARZA, M. T.; CRUZ-VEGA, D. E.; CASTRO-GARZA, J.; MATA-CARDENAS, B. D.; NAQVI, F.; AZAMA, A. Synthesis and *In Vitro* Antiprotozoal Activity of 5-Nitrothiophene-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone Derivatives. *Bioorg.Med. Chem. Letters*, Maryland, v. 12, p. 3475–3478, 2002.
- BLACKMAN, M. J.; HOLDER, A. A. Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by a calcium-dependent membrane- bound serine protease: shedding of MSP1₃₃ as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.50, 307-316, 1992.
- BLOOM, B.R.; MURRAY, C.J.L. Tuberculosis: commentary on reemergent killer. *Science*, Washington, v.257, p. 1055 –1064, 1992.
- BLOOM, B.R.; ROOK, G. A. W. Mechanisms of pathogenesis in tuberculosis. In: BLOOM, B. R.; Ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*, Washington: ASM Press, 1994. p.3-11.
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasitol.*, Amsterdam, v. 28, n.1, 121-134, 1998.
- BOUTOTTE, J. TB the second time around... and how you can help to control it. *Nursing*, Jenkingtown, v. 23, n. 5, p. 42-50, 1993.
- BRAUSCH, L.M.; BASS, J.B. The treatment of tuberculosis. *Med. Clin. North Am.*, Philadelphia, v. 77, n.6, p.1277 –1288, 1993.
- BRENER, Z. A descoberta. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.84 (supl II), p.1- 6, 1989.
- BRENER Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, v. 27, p. 347-382, 1973.

- BRENER, Z. Terapêutica Experimental da Doença de Chagas. In: _____ *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 379-405.
- BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C.J.; MCMASTER, W.R.; MCGWIRE, B.S.; CHANG, K.P.; MOSSER, D.M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.*; Baltimore, v. 155, p. 3102-3111, 1995.
- BROLIO, R.; LIMA FILHO, M. T. Tuberculose pulmonar. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R.; DIETZE, R., Eds. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 2ª ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 325- 343.
- BRYSON, H. M.; GOA, K. L. Halofantrine: a review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drugs*, Auckland, v. 43, n. 2, 236- 258, 1992.
- BUSILLO, C.P.; LESSNAU, K. D.; SAMJANA, V. *et. al.* Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with human immunodeficiency virus infection. *Chest*, Chicago, v. 102, p. 797-801, 1992.
- CARVALHO, P. B. *Leishmanicidas potenciais: Síntese de fármacos dirigidos derivados de inibidores de diidrofolato redutase e pteridina redutase, de ação seletiva em macrófagos*. São Paulo, 2001. [Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP].
- CARVALHO, P. B.; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v. 36, p. 69-96, 2000.
- CECIL, R. L. *Tratado de Medicina Interna*. 18ª Ed.; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.2, p. 1475-1483, 1980.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Tuberculosis elimination revisited: obstacles, opportunities, and a renewed commitment. Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis (ACET). *Morbidity and Mortality weekly report*, v. 48 (RR-9), p. 1-13, 1999.
- CHABALA, J. C. Historical overview of the developing field of molecular diversity. In: GORDON, E.M.; KERWIN, J. F. *Combinatorial chemistry and molecular diversity in drug discovery*. New York: Wiley-Liss, 1998. Cap. 1, p. 3-15.
- CHANG, K.P.; CHAUDURI, G.; FONG, D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, v. 44, p. 499-529, 1990.
- CHANG, K.P.; MCGWIRE, B.S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid biology and disease*. Disponível na internet em: [http://www.kinetoplastids.com/content/1/1/1], 2002. Acessado em 05/02/2004.
- CHANG, K.P.; NACY, C.A. Pearson RD. Intracellular parasitism of macrophages in leishmaniasis: *in vitro* systems and their applications. *Methods Enzymol.*, New York, v.132, p. 603-626, 1986.

- CHANGSEN, C., FRANZBLAU, S. G., PALITTAPONGARNPIM, P. Improved green fluorescent protein reporter gene-based microplate screening for antituberculosis compounds by utilizing an acetamidase promoter. *Antimicrob. Agents Chemother.* Washington DC, v. 47, p. 3682-3687, 2003.
- CHIN, J. Malaria. In: *Control of Communicable Diseases Manual*, 17th Edition. Washington, DC: American Public Health Association, 310-323, 2000.
- CHITNIS, C.E.; BLACKMAN, M.J. Host cell invasion by malaria parasites. *Parasitol. Today*, Amsterdam, v. 16, n. 10, 411-415, 2000.
- CHUNG, M.C., FERREIRA, E.I., O processo de latenciação no planejamento de fármacos. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 22, n.1, p.75-84, 1999.
- CLARK, I.A.; SCHOFIELD, L. Pathogenesis of Malaria. *Parasitol. Today*, Amsterdam, v. 16, n. 10, p. 451 – 454, 2000.
- COLLINS, L. A.; TORRERO, M. N.; FRANZBLAU, S. G. Green Fluorescent Protein Reporter Microplate Assay for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington DC, v. 42, n. 2, p. 344–347, 1998.
- COLSTON, J.M. The molecular basis of mycobacterial infection. *Mol. Aspects Med.*, London, v.17, p. 385-454, 1996.
- CONTRERAS, V.T.; NAVARRO, M.C.; DE LIMA, A.R.; ARTEAGA, R.; DURAN, F.; ASKUE, J.; FRANCO, Y. Production of amastigotes from metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v. 97, n. 8, p. 1213-1220, 2002.
- CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNANDEZ, C.T.; TAPIA, F.J.; CACERES-DITTMAR, G.; CASTES, M.; RONDON, A.J. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 87, n. 4, p. 444-448, 1993.
- COOKE, B.M.; WAHLGREN, M.; COPPEL, R.L. *Falciparum* Malaria: Sticking up, Standing out and Out-standing. *Parasitol. Today*, Amsterdam, v. 16, n. 10, 416-420, 2000.
- COWMAN, A. F.; FOOTE, S. J. Chemotherapy and drug resistance in malaria. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v. 20, n. 4, 503-513, 1990.
- CRAIG, P.N. Interdependence between physical parameters and selection of substituent groups for correlation studies. *J. Med. Chem.*, Washington DC., v. 14, n.8, p. 680-684, 1971.
- CREMIN, B.J. Tuberculosis: the resurgence of our most lethal infectious disease a review. *Pediatr. Radiol.*, Berlin, v. 25, p. 620-26, 1995.
- CROFTON, J. Tuberculosis: World perspectives and the challenges ahead. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 49, suppl. 1, p. 3-6, 1997.

- DEBNATH, A. K.; HANSCH, C. Mechanistic interpretation of the genotoxicity of nitrofurans (Antibacterial agents) using quantitative structure-activity relationships and comparative molecular field analysis. *J. Med. Chem.*, Washington, v.36, p. 1007-1016, 1993.
- DEDET, J. P. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the New World. In: GILLES, H. M., Ed. *Protozoal diseases*. London: Arnold, 1999. p. 490-495.
- DELMAS, F.; GASQUET, M.; TIMON-DAVID, P.; MADADI, N.E.; VANELLE, P.; VAILLE, A.; MALDONADO, J. Synthesis and *in vitro* anti-protozoan activity of new 5-nitrothiophene oxime ether derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, Amsterdam, v.28, p.23-27, 1993.
- DE MAGALHAES, A. V.; MORAES, M. A.; RAICK, A. N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J. M.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Histopathology of tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*: 3. Cellular reactions in tissues. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, São Paulo, v. 28, 300-11, 1986.
- DE SOUZA, W. A Short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, suppl. I, p. 17-36, 1999.
- DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.* V. 86, p.197-283,1984.
- DERETIC, V.; VIA, L.E.; FRATTI, R.A.; DUSANKA, D. Mycobacterial phagosome maturation, rab proteins and intracellular trafficking. *Electrophoresis*, Berlin, v.18, p. 2542- 2547, 1997.
- DIAS, J. C. P. *Chagas' disease – American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine*. [<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/chagas/chapter4.html>] 1992. Acesso em 20/02/2002.
- DIAS, J.C.P. *Doença de Chagas: clínica e terapêutica*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, SUCAM, 1990.
- DIAS, J.C.P. *Doença de Chagas: epidemiologia e prevenção*. *Arq. Bras. Cardiol.*, São Paulo, v.63, p.451-455, 1994.
- DIAS, J.C.P.; BRENER, S. Chagas' disease and blood transfusion. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.79, suppl., p.139-147, 1984.
- DIAS, J.C.P.; JATENE, A.D. Doença de Chagas no Brasil – Situação atual e perspectivas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.25, suppl.3, p. 6-8, 1992.
- DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem. Biol. Interact.*, Claire, v.73, p.1-27, 1990.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S.N.J. Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of American trypanosomes. *Rev. Biochem. Toxicol.*, New York, v.7, p. 159-204,1985.
- DOWLATI, Y. Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Saint Louis, v. 37, p. 139, 1998.
- DUNCAN, K. Prospects for new anti-tuberculosis drugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.49, suppl. 1, p. 21-23, 1997.

- DUPOUY-CAMET J. New drugs for the treatment of human parasitic protozoa. *Parassitologia*. Roma, v. 46, n. 1-2, p. 81-84, 2004.
- EAMES J, WATKINSON M. Polymeric scavenger reagents in organic synthesis. *Eur. J. Org. Chem.*, Berlin. v.7, p.1213-1224, 2001.
- ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.*, v. 47, p. 2393-2404, 2004.
- FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* Amsterdam, v.14, p.187-198, 1985.
- FARINA, M.; ATTIAS, M.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W. Further studies on the organization of the paraxial rod of trypanosomatids. *J. Protozool.*, Lawrence, v.33, p. 552-557, 1986.
- FÄTKENHEUER, G.; TAELEMAN, H.; LEPAGE, P.; SCHWENK, A.; WENZEL, R. The return of tuberculosis. *Diagn. Microbiol. Infect Dis.*, Amsterdam, v. 34, p. 139-146, 1999.
- FERREIRA, E. I. *Planejamento de quimioterápicos antimaláricos e antichagásicos*. Texto apresentado para concurso de livre-docência. São Paulo, 1997.
- FIOCRUZ-1997[<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/index.htm>]
Acessado em 25/02/02.
- FLOHÉ, L.; HECHT, H. J.; STEINERT, P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radical Bioll. Med.*, Amsterdam, v. 27, 9/10, 966-984, 1999.
- FRANCO, M. A. Antimony oxidation states in antileishmanial drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 52, p. 435-37, 1995.
- 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.; FEERGUSON, R.M.; SHEEN, P.; GILMAN, R.H. Rapid low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.32, n.2, p. 362-366, 1998.
- FREE, S. M.; WILSON, J. W. A mathematical contribution to structure-activity studies. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 7, n. 4, p. 395-399, 1964.
- FRY, M.; BEESLY, J. E. Mitochondria of mammalian *Plasmodium* spp. *Parasitology*, Amsterdam, v. 102, p.17-26, 1991.
- GAYO, L. M. Solution-phase library generation: Methods and applications in drug discovery. *Biotechnol. Bioeng.*, New York, v. 61, n. 2, p. 95-106, 1998.
- GAYRAL P.; RIGOTHIER, M.C.; GANTIER, J.C.; COUMES, R.C.; GORRICHON, J.P.; GASET, A. Comparaison des activités antiparasitaires de deux séries d'aldimines des nitro-5-furanne et thiophène. *Eur. J. Med. Chem.*, Amsterdam, v.16, p.151-155, 1981.

- GLEW, R.H.; SAHA, A.K.; DAS, S.; REMALEY, A.T. Biochemistry of the Leishmania species. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.52, 412-432, 1988.
- GRANT, I.; GOLD, J.W.H.; WITTNEE, M.; TANOWITZ, M.B. Transfusion-associated acute Chagas' disease acquired in United States. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v.111, p.849-851, 1989.
- GRAVERT, D. J.; JANDA, K. D. Organic synthesis on soluble polymer supports: Liquid-phase methodologies. *Chem. Rev.*, Washington, v. 97, p. 489-509, 1997.
- GREVELINK, L. Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, New York, v. 34, 257-272, 1996.
- GRINGAUZ, A. *Introduction do medicinal chemistry – how drugs act and why*. New York: Wiley- VCH, p. 265-230, 1997
- GUNAY, N.S.; CAPAN, G.; ULUSOY, N.; ERGENC, N.; OTUK, G.; KAYA, D. 5-Nitroimidazole derivatives as possible antibacterial and antifungal agents. *Farmaco*. v. 54, n. 11-12, p. 826-831, 1999.
- HANSCH, C.; CALEF, D. F. Structure-activity relationships in papain-ligand interactions. *J. Org.Chem.*, Washington, v. 41, n.7, p. 1240-1243, 1976.
- HANSCH, C., LEO, A. *Exploring QSAR: Fundamentals and application in chemistry and biology*, v. 1 e v. 2, New York: ACS Ed., 1995.
- HARDMAN, J. G.; GILMAN, A.G.; LIMBIRD, L. E. *Goodman & Gilman's The pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed.; New York: McGraw-Hill, 1996.
- HARITH, A.E.; SLAPENDEL, R.J.; REITER, I. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J. Clin. Microbiol.*, Amsterdam, v. 27, n. 10, p. 2252-2257, 1989.
- HIEN, T. T.; WHITE, N. J. Qinghaosu. *Lancet*, London, v.341, p.603-608, 1993.
- HOMMEL, M. Malaria: Biology of the parasite and host-parasite relationships. In: GILLES, H. M. , Ed. *Protozoal Diseases*. London: Arnold, 1999. p. 25.
- HUDSON, A.; IMAMURA, T.; GUTTERIDGE, W.; KANYOK, T, NUNN, P. The current anti-TB drug research and development pipeline. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases TDR/PRD/TB/03.1W*, 2003. Acesso em 01/2004.
- HUMMA, L.M. Prevention and treatment of drug-resistant tuberculosis. *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, Bethesda, v.53, p. 2291-2298, 1996.
- INTERNATIONAL UNION AGAINST TUBERCULOSIS AND LUNG DISEASE. Working alliance for TB drug development, Cape Town, South Africa, February 8th, 2000. *Internat. J. Tubercul. Lung Dis.*, v.4, p. 489-490, 2000.
- ISEMAN, M. D. Management of multidrug-resistant tuberculosis. *Chemotherapy*, Basel, v.45, suppl. 2, p. 3-11, 1999a.

- ISEMAN, M.D. Treatment and implications of multidrug-resistant tuberculosis for the 21st century. *Chemotherapy*, Basel, v.45, suppl. 2, p. 34-40, 1999b.
- JAMBOU, D.; MARTY, P.; JAMBOU, R. Preliminary serological study on canine leishmaniasis in the Alpes-Martimes Departement, France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 80, p. 666- 667, 1986.
- JEFFREY, H.C.; LEACH, R.M. Atlas of medical helminthology and protozoology, 3rd Ed., New York: Churchill Livingstone, 1991.
- KIERSZENBAUM, F.; HUDSON, L.; Autoimmunity in Chagas disease: Cause or symptom? *Parasitol. Today*, Amsterdam, v. 1, p. 4-9, 1985.
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Ent.*, London, v. 4, p. 1-24. 1990.
- KLEIN, W.; KÖRDEL, W.; WEIB, M.; POREMSKI, H. J. Updating of the OECD Test Guideline 107 "Partition Coefficient N-Octanol/Water": OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. *Chemosphere*, Amsterdam, v. 17, p. 361- 386, 1988.
- KOROLKOVAS, A. *Essentials of medicinal chemistry*. 2. Ed.; New York: Wiley-Interscience, 1988.
- KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico Guanabara, Ed.2004/2005*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.
- KRISHNA, S. Science, medicine and the future: malaria. *Br. Med. J.*, London, v. 315, 730-732, 1997.
- KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U., Eds. *A textbook of drug design and development*, Harwood: Academic Publishers, 2. Ed, 1996.
- KUBINYI, H. Quantitative Structure-Activity Relationships. 7.' The Bilinear Model, a New Model for Nonlinear Dependence of Biological Activity on Hydrophobic Character. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 20, n. 5, p. 625, 1977.
- KUBINYI, H. QSAR: *Hansch analysis and related approaches*. v. 1, New York: VCH, 1993.
- LACERDA, M.M. The Brazilian Leishmaniasis control program. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, Rio de Janeiro, v. 89, p.489-495, 1994.
- LAGUNA, F.; ADRADOS, M.; ALVAR, J. Visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, Munich, v. 16, p. 898-903, 1997.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*, London, v. 273, p. 595-600, 1978.
- LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Méd.*, New York, v. 168, p. 649-659, 1988.

- LIMA, M.M.; BELLUOMINI, M.; ALMEIDA, M.M.M.B.; ARANTES, G.R.; Co-infecção HIV/tuberculose: necessidade de uma vigilância mais efetiva. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.31, p. 217- 220, 1997.
- LINUSSEN, A.; GOTTFRIES, J.; OLSSON, T.; ORNSKOV, E.; FOLESTAD, S.; NORDEN, B.; WOLD, S. Statistical molecular design, parallel synthesis, and biological evaluation of a library of thrombin inhibitors. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 44, p.3424-3439, 2001.
- MAGILL, A. J. Epidemiology of the leishmaniasis. *Dermatol. Clin.*, Philadelphia, v. 13, p. 505-523, 1995.
- MAKLER MT, HINRICHS DJ, Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 48, n. 2, p. 205 – 210, 1993.
- MCGWIRE B.S.; O'CONNELL W.A.; CHANG K.P.; ENGMAN D.M. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis. *J. Biol. Chem.*, Maryland, v. 277, p.8802-8809, 2002.
- MCKEAN, P.G.; KEEN, J.K.; KELLY, J.M.; SMITH, D.F. Molecular parasitology: new insights. *Parasitol. Today*, Amsterdam., v. 15, 469-470, 1999.
- MELLO, F.A.F.; AFIUNE, J.B. Quimioterapia da tuberculose: bases, condutas e procedimentos. *J. Pneumol.*, São Paulo, v. 19, p. 42-49, 1993.
- MILDER, R.; KLOETZEL, J. The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages *in vitro*. Interaction with lysosomes and host cell fate. *Parasitology*, Amsterdam, v.80, p. 139-145, 1980.
- MILES, M. A. Chagas disease: The agent. In: GILLES, H. M., Ed. *Protozoal diseases*. London: Arnold, 1999. p. 313.
- MIKUS, J.; STEVERDING, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitol. Int.*, Amsterdam, v. 48, p. 265-269, 2000.
- MIRRELES, M.S.; MOULTON, S.J.; MURPHY, C.T.; TAYLOR, P.J. Direct measurement of octanol-water partition-coefficients by high-pressure liquid-chromatography. *J. Med. Chem.*, Washington, v.19, p. 615, 1976.
- MOLTENI, V.; ANNUNZIATA, R.; CINQUINI, M.; COZZI, F.; BENAGLIA, M. Soluble polymer- supported synthesis of imines and beta-lactams. *Tetrahedron Lett.* Oxford, v. 39, p. 1257-1260, 1998.
- MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. *Exp. Parasitol.*, New York, v. 73, p. 1-14, 1991.
- MORTARA, R. A.; PROCÓPIO, D. O.; BARROS, H. C.; VERBISCK, N. V.; ANDREOLI, W. K.; SILVA, R. B. S.; DA SILVA, S. Features of host cell invasion by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 94, suppl. I, p. 135-137, 1999.

- MOSS, W. H. Introduction: *Combinatorial chemistry approaches the next millenim*. In: CZARNIK, A. W.; DeWITT, S. H., Eds. *A pratical guide to combinatorial chemistry*. American Chemical Society: Washington, 1997. p. 1-16.
- MOUTIEZ, M.; MEZIANE-CHERIF, D.; AUMERCIER, M.; SERGHERAERT, C.; TARTAR, A. Compared reactivities of trypanothione and glutathione in conjugation reactions. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v. 42, 2641– 2644, 1994.
- MUSSER, J.M. Antimicrobial agent resistance in Mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v. 8, p. 496-514, 1995.
- NAKAMURA, D.S. *Avaliação da atividade antibacteriana in vitro de compostos derivados do ácido isonicotínico frente ao Mycobacterium tuberculosis. São Paulo, p. 19-23, 1998.*[Dissertação – Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
- NCHINDA, T.C. Malaria, a re-emerging disease in Africa. *Emerg. Infec. Dis.*, Amsterdam, v. 4, 398–403, 1998.
- NEAL, R.A, Experimental chemoterapy. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R., Eds. *The leishmaniasis in biology and medicine*, vol. 2, London: Academic Press, 1987. p.793- 846.
- Network Science. *An introduction to QSAR methodology* [on line]
[<http://www.netsci.org/Science/Compchem/feature19.html>].
- NICKERSON P.; ORR, P.; SCHROEDER, M.C.; SEKLA, L.; JOHNSON, J. Transfusion associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v.111, p.851-853, 1981.
- NYAKUNDI, P. M. Is one year follow-up justified in kala-azar post-treatment? *E. Afr. Med. J.*, Nairobi, v. 71, p. 453-459, 1994.
- OLIVEIRA FILHO, A.M.; MELO, M.T.V. Vectors control importance on leishmaniasis transmission. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 89, p. 451-56, 1994.
- OLLIARO, P.C.; BRYCESON, A.D.M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol. Today*, Amsterdam, v. 9, p. 323-328, 1993.
- ORME, I. Mechanisms underlying the increased susceptibility of aged nice to tuberculosis. *Nutr. Rev.*, New York, v. 53, p. S35-40, 1995.
- PAGES, M.; BASTIEN, P.; VEAS, F. Chromossome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v. 36, p. 161-168, 1989.
- PAHO-PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION *Regional plan for action for combating new emerging and reemerging infectious diseases*. Resolution CD38/17, August 1995 Pan American Health Organization, Washington, DC, USA.
- PAN, A. A.; MCMAHON-PRATT, D. Amastigote and epimastigote stage-specific components of *Trypanosoma cruzi* characterized by using monoclonal antibodies. *J Immunol.*, Baltimore, v.143, p. 1001-1008, 1989.

- PATANI, G.A.; LaVOIE, E. J. Bioisosterism: a rational approach in drug design. *Chem. Rev.*, Washington, v. 96, p. 3147-3176, 1996.
- PATRICK, G. L. *An Introduction to medicinal chemistry*. 1st. Ed. New York: Oxford University Press, 1995.
- PÉCOUL, B. Access to essential drugs in poor countries. A lost battle? *J. Am. Med. Ass.*, Chicago, v. 281, p. 361-367, 1999.
- PEREZ, H.; DE LA ROSA, M.; MALAVE, I. The effect of protein restriction on the development of protective immunity to *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol.*, Amsterdam, v. 6, p. 285- 294, 1984.
- PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. R. *Purification of laboratory chemicals*. Oxford: Pergamon Press, 2. ed., 1980.
- PETERS, W. Mefloquine/sulfadoxine/pyrimetamine for malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 89, n. 6, 699, 1995.
- PHILIPP, W.J.; SCHWARTZ, D.C.; TELENTI, A.; STEWART, C.T. Mycobacterial genome structure. *Electrophoresis*, Berlim, v. 19, p.573-576, 1998.
- PINTO, A.Y.N.; HARADA, G.S.; VALENTE, V.C.ABUD, J. E.; GOMES, F. D.; SOUZA, G. C.; VALENTE, S. A. Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio DE Janeiro, v. 34, p. 413-419, 2001.
- PIRES, J.R.M. *Relações quantitativas entre a estrutura química de derivados nitrofurânicos e a atividade antimicrobiana contra* *Caulobacter crescentus* e *Staphylococcus aureus*. São Paulo, p. 91-95, 1998. [Tese – Doutorado – Instituto de Química da Universidade de São Paulo].
- POZAS, R.; CARBALLO, J.;CASTRO C.; RUBIO, J. Synthesis and *in vitro* antitrypanosomal activity of novel Nifurtimox analogues. *Bioorg. Med. Chem. Letters*. Oxford, v. 15, n. 1, p. 1417-1421, 2005.
- PREISER, P.; KAVIRATNE, M.; KHAN, S.; BANNISTER, L.; JARRA, W. The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect.*, Amsterdam, v. 2, 1461- 1477, 2000.
- RACE, P.R.; LOVERING, A. L.; GREEN, R. M.; OSSOR, A.; WHITE, S. A.; SEARLE, P.F.; WRIGHTON, C. J.; HYDE, E. I. Structural and Mechanistic Studies of *Escherichia coli* Nitroreductase with the Antibiotic Nitrofurazone: Reversed binding orientations in different redox states of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, Maryland, v. 280, n. 14, p. 13256-13264, 2005.
- RANDO, D. G.; BRANDT, C. A.; FERREIRA, E. I. Use of N-methylene phosphonic chitosan to obtain na isoniazid prodrug. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 335-344, 2004.
- RANDO, D. G.; SATO, D. N.; SIQUEIRA, L.; MALVEZZI, A.; LEITE, C. Q. F.; DO AMARAL, A. T.; FERREIRA, E. I.; TAVARES, L. C. Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid [(5-nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. *Bioorg.Med. Chem.* Oxford, v.10, p. 557-560, 2002.

- RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg. Infect. Dis.*, Atlanta, v.4, n.2, p. 195-208, 1998.
- REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol. Today*, Amsterdam, v.16, p.246-250, 2000.
- REY, L. *Parasitologia*. 2^a ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1991. p. 138,193, 204, 215.
- REZAI, H.R.; BEHBEHANI, A.B.; GETTNER, S.; ARDEHALI, S. Effect of levamisole on the course of experimental leishmaniasis in guinea-pigs and mice: haematological and immunological findings. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Liverpool, v. 82, p. 243-249, 1988.
- ROACH, T.; BARTON, C.H.; CHATTERJEE, D.; BLACKWELL, J.M. Macrophage activation; lipoarabinomannan (LAM) from avirulent and virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* differentially induces the early genes c-fos, KC, JE and tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.*, Baltimore, v. 150, p. 1886-1896, 1993.
- ROBBINS, S. L.. *Patologia Estrutural e Funcional*. 5^a Ed.; Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p.286-289 e 622- 625.
- ROSENTHAL, P. J.; MESHNICK, S. R. Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.83, 131-139, 1996.
- ROSS, W.J. Chemotherapy of trypanosomiasis and other protozoan diseases. In: WOLFF, M. E., Eds. *Burger's medicinal chemistry*, 4th ed, v.2, New York: Wiley, 1980. p.440-479.
- SAM-YELLOWE, T.Y. Rhoptry organelles of the Apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival, *Parasitol. Today*, Amsterdam, v. 12, p.308-316, 1996.
- SCHLEIN, Y.; WARBURG, A.; SCHNUR, L.F.; LE BLANCQ, S.M.; GUNDERS, A.E. Leishmaniasis in Israel: reservoir hosts, sandfly vectors and leishmanial strains in the Negev, Central Arava and along the Dead Sea. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 78, p. 480-484, 1984.
- SELIGMANN, B.; LEBL, M.; LAM, K.L. Solid-phase peptide synthesis, lead generation and optimization. In: GORDON, E.M.; KERWIN, J. F. *Combinatorial chemistry and molecular diversity in drug discovery*. New York: Wiley-Liss, 1998. Cap. 3, p. 39-109.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MARCONDES, C.B.; GUEDES, L.A, SIQUEIRA, G. S.; BARONE, A. A.; DIAS, J. C.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J. E.; PERES, B. A.; ARRUDA JUNIOR, E. R. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. *Rev. Inst. Med.Trop. S. Paulo*, São Paulo, v. 33, p. 351-357, 1991.
- SHIMAO, T. Drug resistance in tuberculosis control. *Tubercle*, London, v. 68, p. 5-15, 1987.
- SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, v.41, 363-382, 1987.

- SINGH, S, SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother.* V. 10, n. 6, p.307-315, 2004.
- SLOMIANNY, G. Three-dimensional reconstruction of the feeding process of the malaria parasite. *Blood Cells*, Berlin, v.16, 369–378, 1990.
- SMITH, P. G.; MOSS, A. R. Epidemiology of tuberculosis. In: BLOOM, B.R., Ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington: ASM Press, 1994. p. 47-59.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. *Novo Relatório de Disseminação de TB-MDR*, 1999. [on line] [<http://www.nib.unicamp.br/sbpt>]
- SOUZA, J. M. *P. falciparum* strain resistance to drugs. New drug trials. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v. 34, supl. 9, S10-S15, 1992.
- SRIVASTAVA, A.; CHERIAN, A.M. Recent trends in the chemotherapy of tuberculosis. *Indian J. Med. Sci.*, Bombay, v. 41, p. 17-19, 1987.
- STURGILL, S.K.; SCHLESINGER, H.P.; CHAKRABORTY, P.; HADDIX, P.L.; COLLINS, H.L.; FOK, A.K.; ALLEN, R.D.; GLUCK, S.L.; HEUSER, J.; RUSSELL, D.G. Lack of acidification in mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, Washington, v.265, p.678- 681, 1994.
- TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int. J. Parasitol.*, Amsterdam, v. 31, p. 550-554, 2001.
- TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. *Quím. Nova*, São Paulo, v.27, n.4, p.631-639, 2004.
- TAVARES, L. C.; FERREIRA, E. I. Relações quantitativas entre estrutura-atividade: fundamentos e aplicações da análise de Hansch. In: Prado, M.A.; Barreiro, E. J. (Org). *Práticas de Química Farmacêutica y Medicinal*. Pamplona: CYTED. 2002. p. 36-66.
- TAVARES, L. C. *Relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade antimicrobiana de análogos à nifuroxazida*. São Paulo, p. 89-90, 1993. [Tese–Doutorado–Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
- TAYLOR, J. B., KENNEWELL, P.D. *Modern Medicinal Chemistry*. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1993.
- TEDLAOUTI, F.; GASQUET, M.; DELMAS, F.; MAJESTER, B.; TIMON-DAVID, P.; MADADI, N.E.; VANELLE, P.; MALDONADO, J. Synthesis and study of antiprotozoal activity of some 5-nitrothiophene aldimines. *Farmaco*, Amsterdam, v. 46, p. 1195-1201, 1991.
- TEDLAOUTI, F.; GASQUET, M.; DELMAS, F.; TIMON-DAVID, P.; MADADI, N.E.; VANELLE, P.; MALDONADO, J. Evaluation of the antimalarial activity of new compounds against *Plasmodium falciparum* in vitro, and *Plasmodium berghei* in vivo. *J. Pharm. Belg.*, Bruxelas, v.45, p. 306-310, 1990.
- TESTA, B. Prodrug research: futile or fertile? *Biochem. Pharmacol.*, v.68, p. 2097-2106, 2004.

- THE INTERNATIONAL QSAR AND MODELLING SOCIETY. *Background to QSAR* [on line] [<http://www.pharma.ethz.ch/qsar/>], 2000. Acesso em 2/02/2002.
- THE INTERNET PATHOLOGY LABORATORY. *Pathology of Tuberculosis* [online] [<http://www.medlib.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/MTB/MTB.html>], 1999. Acesso em 2/02/2002
- THOMPSON, L. A.; ELLMAN, J. A. Synthesis and applications of small molecule libraries *Chem. Rev.*, Washington, v. 96, p. 555-600, 1996.
- TOLINS, J.P.; RAIJ, L. Chronic amphotericin B nephrotoxicity in the rat, protective effect of prophylactic salt loading. *Am. J. Kidney Dis.*, New York, v. 11, 313-317, 1988.
- TOPLISS, G.J. A manual method for applying the Hansch approach to drug design. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 20, n.4, p. 463-469, 1997.
- TOPLISS, G.J. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. *J. Med.Chem.*, Washington, v.15, n.10, p. 1006-1011, 1972.
- TORII M.; ADAMS J.H.; MILLER L.H.; AIKAWA M. Release of merozoite dense granules during erythrocyte invasion by *Plasmodium knowlesi*, *Infect. Immun.* Amsterdam, v. 57, p.3230-3233, 1989.
- TRIPATHI, A.K., GARG, S.K., TEKWANI, B.L. A physiochemical mechanism of hemozoin (beta- hematicin) synthesis by malaria parasite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v. 11, p. 595- 601, 2002.
- TSUHAKO, M.H.; ALVES, M.J.M.; COLLI, W.; BRENER, Z.E.; AUGUSTO, O. Restricted bio-reductive metabolism of nitroimidazole-thiadiazol derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v.38, p.4491- 4496, 1989.
- UMEZAWA, E. S.; MILDRE, R. V.; ABRAHAMSOHN, I. A. *Trypanosoma cruzi* amastigotes: development *in vitro* and infectivity *in vivo* of the forms isolated from spleen and liver. *Acta Trop.*, Basel, v. 42, p. 25-32, 1985.
- UNGER, S. H.; HANSCH, C. On Model Building in Structure-Activity Relationships. A Reexamination of Adrenergic Blocking Activity of O-Halo-O-alkyl amines. *J. Med. Chem.*, Washington, v. 16, n. 7, p. 745-749, 1973.
- VANELLE, P.; GHEZALI, S.; MALDONADO, J.; CROZET, M.P.; DELMAS, F.; GASQUET, M.; TIMON-DAVID, P. New 2-alkylidenemethyl-5-nitrothiophenes: preparation via $S_{RN}1$ reactions and *in vitro* antiprotozoan activity. *Eur. J. Med. Chem.*, Amsterdam, v.29, p.41- 44, 1994.
- VILLALTA, F.; KIERSZENBAUM, F. Role of inflammatory cells in Chagas' disease. II. Interactions of mouse macrophages and human monocytes with intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*: uptake and mechanism of destruction. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 133, p. 3338-3343, 1984.
- WENDEL, S. Transfusion-transmitted Chagas' disease. *Curr. Opin. Hematol.*, Philadelphia, v.5, p. 406-411, 1998.

- WERMUTH, C.G., Design prodrugs and bioprecursors. In: LOLLES, G., WOOLDRIDGE, K.R.H., Eds. *Drug design: fact or fantasy?* New York: Academic Press, 1984.
- WERMUTH, C.G. Molecular variations based on isosteric replacements. In: _____ Ed. *The practice of medicinal chemistry*. London: Academic Press, 2003a. p. 189-214.
- WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: _____ Ed. *The practice of medicinal chemistry*. London: Academic Press, 2003b. p. 697-716.
- WESS, G.; URMANN, M.; SICKENBERGER, B. Medicinal chemistry: challenges and opportunities. *Angew. Chem. Int. Ed.*, New York, v. 40, n. 18, p. 3341-3350, 2001.
- WHITE, J.H.; KILBEY, B.J. DNA replication in the malaria parasite. *Parasitol. Today*, Amsterdam, v.12, p.151-155, 1996.
- WILLIARD, X.; POP, I.; BOUREL, L. HORVATH, D.; BAUELLE, R.; MELNYK, P.; DÉPREZ, B.; TARTAR, A. Combinatorial chemistry: a rational approach to chemical diversity. *Eur. J. Med. Chem.*, Amsterdam, v. 31, p. 87-98, 1996.
- WIRTH, D.F.; PRATT, D.M. Rapid identification of Leishmania species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, New York, v. 79, p. 6999-7003, 1982.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Who model prescribing information—*Drugs used in mycobacterial diseases*, Genebra, p. 3-23, 1991.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tuberculosis control and research strategies for 1990s: Memorandum from WHO meeting. *Bull. WHO*, Genebra, v.70, n.1, p. 17-21, 1992a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION World malaria situation in 1990. *Bull. WHO*, Geneva, v. 70, n. 6, 801-807, 1992b.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Tratamiento de la tuberculosis*. Genebra, p. 40-41, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Anti-tuberculosis drug resistance in the world*. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Genebra, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION-Fact Sheet No 94 Malária (1998) <http://www.who.int/inf-fs/en/fact094.html> Acesso em 25/02/2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION UNDP/World Bank/WHO – *Special programme for research and training in tropical diseases*. Disponível na internet <http://who.ch/programmes/tdr/workplan/leishman.htm>. 1998a. Acesso em 25/02/2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control. *Tuberculosis handbook*, Genebra, 1998b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *DOTS: Directly Observed Treatment Short- course*. Disponível na internet [http:// who.int/gtb/dots/index.htm](http://who.int/gtb/dots/index.htm); 1998c. Acesso em 24/02/02.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Division of Control of Tropical Diseases. <http://www.who.ch/programmes/ctd/diseases/leis/leisdis.htm>. Acesso em 3/08/1998d.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Roll Back Malaria – Malaria a global crisis. Disponível na internet <http://www.who.int> 2000a, Acesso em 25/02/2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível na internet <http://www.who.int/ctd/html/chagdts/html>, 2000b. Acesso em 24/02/02.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Anti-tuberculosis drug resistance in the world*, Report n.2, Prevalence and Trends, Genebra, 2000c.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control. *WHO report 2000*, Genebra, 2000d.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control. *WHO report 2001*, Genebra, 2001a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Leishmaniasis*. 2001b Disponível na internet: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/leishwhodocs.html> Acesso em 01/06/01.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível na internet <http://www.who.int/tdr/diseases/tb/diseaseinfo.htm>, 2004a. Acesso em 10/02/2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível na internet <http://www.who.int/tdr/diseases/malaria/diseaseinfo.htm>, 2004b. Acesso em 10/02/2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível na internet <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>, 2004c. Acesso em 10/02/2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível na internet <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/diseaseinfo.htm>, 2004d. Acesso em 10/02/2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . Disponível na internet [http:// www.who.int/ctd/chagas/achieve.htm](http://www.who.int/ctd/chagas/achieve.htm), 2005. Acesso em 02/04/2005.

XIMENES, R. A. A.; MARTELLI, C. M. T.; SOUZA, W.V.; LAPA, T.M.; ALBUQUERQUE, M. F. M.; ANDRADE, A. L. S. S.; MORAES NETO, O. L.; SILVA, S. A.; LIMA, M. L. C.; PORTUGAL, J. L. Vigilância de doenças endêmicas em áreas urbanas: a interface entre mapas de setores censitários e indicadores de morbidade. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 15, n.1, p. 53-61, 1999.

YEW, W.W. Directly observed therapy, short-course: the best way to prevent multidrug-resistant tuberculosis. *Chemotherapy*, Basel, v.45, suppl. 2, p.26-33, 1999.

YOUNG, D.G.; ARIAS, J.R. *Flebotomos: vectores de leishmaniasis en Las Americas*. Pan American Health Organization, Cuaderno Técnico No. 33. Pan American Health Organization, Washington, D.C., USA. 1992.

- YOUNG, J.A.; DURREL, W.S.; DRESDNER, R.D. Fluorocarbon nitrogen compounds. 8. Mono-, di-, tri- and tetra-acyl derivatives, oxadiazoles and omega-bromoacyl isocyanates. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.84, p. 2105, 1962.
- ZHANG, M.; GATELY, M. K.; WANG, E.; GONG, J.; WOLF, S. F.; LU, S.; MODLIN, R. L.; BARNES, P. F. Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v.93, p.1733-1739, 1994.
- ZHANG, Y.; BROSER, M.; COHEN, H.; BODKIN, M.; LAW, K.; REIBMAN, J.; ROM, W.N. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v.95, p. 586 –592, 1995.
- ZANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite Persistence Correlates with Disease Severity and Localization in Chronic Chagas' Disease *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.180, p. 480-486, 1999.

APÊNDICE A

PARTE 1

COMPOSTO 2

Atribuições de RMN para o composto 2

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
3,92 (s, 3 H, H ₁), 7,42 (d, 2H, J _{orto} = 8,29, H ₅ e H ₇), 7,97 (d, 2H, J _{orto} = 8,29, H ₄ e H ₈)	52,26 (C ₁), 128,71 (C ₅ e C ₇), 130,57 (C ₄ e C ₈), 139,38 (C ₃), 140,98 (C ₆), 166,25 (C ₂)

RMN-¹H, 300 MHz, CDCl₃

RMN- ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3

Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3483	ν C-H aromático
2904	ν C-H metila
1684	ν C=O de éster
1591-1401	ν HC=CH aromático
1090	ν C-Cl aromático substituído em <i>para</i>
852	δ C-H aromático monossubstituído

COMPOSTO 3

Atribuições de RMN para o composto 3

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
3,85 (s, 3H, H ₁), 3,88 (s, 3H, H ₉), 6,92 (d, 2H, J _{orto} = 8,82, H ₅ e H ₇), 8,00 (d, 2H, J _{orto} = 8,82, H ₄ e H ₈)	51,82 (C ₁), 55,37 (C ₉), 113,70 (C ₅ e C ₇), 132,29 (C ₃), 131,56 (C ₄ e C ₈), 163,31 (C ₆), 166,86 (C ₂)

RMN-¹H, 300 MHz, CDCl₃

RMN- ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3

Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

2952	ν C-H assimétrico de metila
2841	ν C-H simétrico de metila
1706	ν C=O de éster
1606 – 1429	ν HC=CH aromático
848	δ C-H aromático <i>p</i> -substituído

COMPOSTO 4

Atribuições de RMN para o composto 4

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
3,04 (s, 6H, H ₉ e H _{9'}), 3,86 (s, 3H, H ₁), 6,67 (d, 2H, J _{orto} = 8,85, H ₅ e H ₇), 7,91 (d, 2H, J _{orto} = 8,85, H ₄ e H ₈)	40,23 (C ₉ e C _{9'}), 51,55 (C ₁), 110,91 (C ₅ e C ₇), 131,29 (C ₃ , C ₄ e C ₈), 153,15 (C ₆), 167,50 (C ₂)

RMN-¹H, 300 MHz, CDCl₃

RMN- ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3 Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

2921	$\nu \text{C-H metila}$
1702	$\nu \text{C=O de éster}$
1611 – 1438	$\nu \text{HC=CH aromático}$
1373	$\nu \text{C-N do grupo amina}$
827	$\delta \text{C-H aromático } p\text{-substituído}$

COMPOSTO 5

Atribuições de RMN para o composto 5

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
3,85 (s, 3H, H ₁), 4,04 (s largo, 2H, H ₉), 6,64 (d, 2H, J _{orto} = 8,78, H ₅ e H ₇), 7,85 (d, 2H, J _{orto} = 8,78, H ₄ e H ₈)	51,63 (C ₁), 113,81 (C ₅ e C ₇), 131,61 (C ₄ e C ₈), 140,99 (C ₃), 150,83 (C ₆), 167,20 (C ₂)

RMN-¹H, 300 MHz, CDCl₃

RMN- ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3 Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3411 e 3335	ν N-H de grupo amina primária aromática
2940	ν C-H metila
1686	ν C=O de éster
1637 – 1436	ν HC=CH aromático
847	δ C-H aromático <i>p</i> -substituído

COMPOSTO 6

Atribuições de RMN para o composto 6

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
3,90 (s, 3H, H ₁), 6,89 (d, 2H, J _{orto} = 8,78, H ₅ e H ₇), 7,95 (d, 2H, J _{orto} = 8,78, H ₄ e H ₈)	52,14 (C ₁), 115,32 (C ₅ e C ₇), 122,14 (C ₃), 131,98 (C ₄ e C ₈), 160,41 (C ₆), 167,58 (C ₂)

RMN-¹H, 300 MHz, CDCl₃

RMN- ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3 Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3302	$\nu \text{O-H}$ fenólico
1681	$\nu \text{C=O}$ de éster
1595 - 1433	$\nu \text{HC=CH}$ aromático
850	$\delta \text{C-H}$ aromático <i>p</i> -substituído

COMPOSTO 7

Atribuições de RMN para o composto 7

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
4,12 (sl, 2H, H ₁), 7,26 (s, 1H, H ₂) 7,42 (t, 2H, J _{orto} = 7,021, J _{meta} = 1,40, H ₆ e H ₈) 7,51 (t, 1H, H ₇), 7,76 (d, 2H, J _{orto} = 7,021, J _{meta} = 1,40, H ₅ e H ₉)	126,84 (C ₆ e C ₈), 128,66 (C ₅ e C ₉) 131,85 (C ₇), 132,57 (C ₄), 168,69 (C ₃)

RMN-¹H, 300 MHz, CDCl₃

RMN- ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3

Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3299	$\nu \text{ N-H}$ hidrazida
3198	$\nu \text{ N-H}$ do NH_2 da hidrazida
3015	$\nu \text{ C-H}$ aromático
1660	$\nu \text{ C=O}$ de hidrazida
1615 – 1564	$\nu \text{ HC=CH}$ aromático
805	$\delta \text{ C-H}$ aromático <i>p</i> -substituído

COMPOSTO 8

Atribuições de RMN para o composto 8

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
4,56 (s, 2H, H ₁), 7,52 (d, 2H, J _{orto} = 8,48, H ₆ e H ₈), 7,83 (d, 2H, J _{orto} = 8,48, H ₅ e H ₉), 9,85 (s, 1H, H ₂)	125,89 (C ₆ e C ₈), 128,19 (C ₅ e C ₉), 131,00 (C ₄), 151,60 (C ₇), 166,17 (C ₃)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

RMN- ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3

Infravermelho, KBr, $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$

3303	$\nu\text{ N-H}$ hidrazida e/ou $\nu\text{ N-H}$ do NH_2
1659	$\nu\text{ C=O}$ de hidrazida
1635 – 1483	$\nu\text{ HC=CH}$ aromático
1010	$\nu\text{ C-Cl}$ aromático em <i>para</i>
856	$\delta\text{ C-H}$ aromático <i>p</i> -substituído

COMPOSTO 9

Atribuições de RMN para o composto 9

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
3,85 (s, 3H, H ₁₀), 6,92 (d, 2H, J _{orto} = 8,64, H ₆ e H ₈), 7,51 (s, 1H, H ₂) 7,80 (d, 2H, J _{orto} = 8,64, H ₅ e H ₉)	55,43 (C ₁₀), 113,97 (C ₆ e C ₈), 125,92 (C ₄), 128,69 (C ₅ e C ₉), 162,62 (C ₇), 168,36 (C ₃)

RMN-¹H, 300 MHz, CDCl₃

RMN- ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3

Infravermelho, KBr, $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$

3325	$\nu\text{ N-H}$ hidrazida
3055	$\nu\text{ N-H}$ do NH_2 da hidrazida
2959	$\nu\text{ C-H}$ assimétrico de metila
2837	$\nu\text{ C-H}$ simétrico de metila
1614	$\nu\text{ C=O}$ de hidrazida
1534 – 1494	$\nu\text{ HC=CH}$ aromático
844	$\delta\text{ C-H}$ aromático <i>p</i> -substituído

COMPOSTO 10

Atribuições de RMN para o composto 10

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
3,02 (s, 6H, H ₁₀ e H _{10'}), 6,67 (d, 2H, J _{orto} = 8,85, H ₆ e H ₈), 7,37 (s, 1H, H ₂), 7,66 (d, 2H, J _{orto} = 8,85, H ₅ e H ₉)	40,11 (C ₁₀ e C _{10'}), 110,91 (C ₆ e C ₈), 128,33 (C ₅ e C ₉), 131,27 (C ₄), 152,70 (C ₇), 168,88 (C ₃)

RMN-¹H, 300 MHz, CDCl₃

RMN- ^{13}C , 75 MHz, CDCl_3 Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3283	ν N-H hidrazida
3178	ν N-H do NH ₂ da hidrazida
2911	ν C-H assimétrico de metila
2812	ν C-H simétrico de metila
1641	ν C=O de hidrazida
1604 – 1442	ν HC=CH aromático
1371	ν C-N da amina substituinte do aromático
835	δ C-H aromático <i>p</i> -substituído

COMPOSTO 11

Atribuições de RMN para o composto 11

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
4,28 (s, 2H, H ₁), 5,56 (s, 2H, H ₁₀), 6,51 (d, 2H, J _{orto} = 7,79, H ₆ e H ₈), 7,53 (d, 2H, J _{orto} = 7,79, H ₅ e H ₉), 9,24 (s, 1H, H ₂)	112,49 (C ₆ e C ₈), 119,86 (C ₄), 125,35 (C ₅ e C ₉), 151,43 (C ₇), 166,34 (C ₃)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO- d_6 Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3428	ν N-H de amina primária aromática
3345	ν N-H do NH da hidrazida
3234	ν N-H do NH_2 da hidrazida
1616	ν C=O de hidrazida
1548 – 1502	ν HC=CH aromático
841	δ C-H aromático <i>p</i> -substituído

COMPOSTO 12

Atribuições de RMN para o composto 12

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
4,38 (s, 2H, H ₁), 6,77 (d, 2H, J _{orto} = 7,68, H ₆ e H ₈), 7,68 (d, 2H, J _{orto} = 7,68, H ₅ e H ₉), 9,49 (s, 1H, H ₂), 9,91 (sl, 1H, H ₁₀)	114,75 (C ₆ e C ₈), 123,89 (C ₄), 128,74 (C ₅ e C ₉), 159,93 (C ₇), 165,87 (C ₃)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO- d_6 Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3305	ν N-H do NH_2 da hidrazida e ν O-H fenólica
3194	ν N-H do NH da hidrazida
1605	ν C=O de hidrazida
1535 – 1465	ν HC=CH aromático
847	δ C-H aromático <i>p</i> -substituído

COMPOSTO 13

Atribuições de RMN para o composto 13

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
7,61 (m, 3H, $J_{\text{orto}} = 7,16$ e $J_{\text{meta}} = 1,13$, H ₁₂ , H ₁₃ , H ₁₄), 7,94 (d, 2H, $J_{\text{orto}} = 7,16$ e $J_{\text{meta}} = 1,13$, H ₁₁ , H ₁₅), 8,19 (d, 1H, $J_{4,3} = 4,14$, H ₄), 8,73 (d, 1H, $J_{3,4} = 4,14$, H ₃), 9,04 (sl, 1H, H ₆), 12,20 (s, 1H, H ₈)	128,60 (C ₁₂ e C ₁₄), 129,44 (C ₁₁ e C ₁₅), 130,51 (C ₁₃), 131,38 (C ₃ e C ₄), 132,06 (C ₁₀), 132,77 (C ₂), 142,50 (C ₆), 147,60 (C ₉)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO-d_6 Infravermelho, KBr, $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$

1649	$\nu\text{ C=O}$
1542	$\nu\text{ N-O}$ assimétrico do NO_2
1432	$\nu\text{ C-H}$ do anel tiofênico
1331	$\nu\text{ N-O}$ simétrico do NO_2
731 e 694	$\delta\text{ C-H}$ aromático monossustituído

COMPOSTO 14

Atribuições de RMN para o composto 14

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
7,58–7,6.3 (m, 3H, $J_{\text{orto}} = 8,29$, H ₁₁ , H ₁₅ e H ₆), 7,92 (d, 2H, $J_{\text{orto}} = 8,29$, H ₁₂ e H ₁₄), 8,12 (d, 1H, $J_{4,3} = 4,14$, H ₄), 8,65 (d, 1H, $J_{3,4} = 4,14$, H ₃), 12,29 (s, 1H, H ₈)	128,61 (C ₄), 129,65 (C ₁₂ and C ₁₄), 129,85 (C ₁₁ and C ₁₅), 130,50 (C ₃), 131,52 (C ₁₀), 137,01 (C ₂), 141,48 (C ₁₃), 146,50 (C ₆), 147,00 (C ₅), 162,20 (C ₉)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO- d_6

Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

1649	$\nu \text{C=O}$
1593	$\nu \text{C=N}$
1560	$\nu \text{N-O}$ assimétrico do NO_2
1434	$\nu \text{C-H}$ do anel tiofênico
1360	$\nu \text{N-O}$ simétrico do NO_2
1103	$\nu \text{C-Cl}$ em <i>para</i> no aromático

COMPOSTO 15

Atribuições de RMN para o composto 15

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
3,84(s, 3H, H ₁₆), 7,07(d, 2H, J _{orto} = 8,85 e J _{meta} = 1,88, H ₁₂ e H ₁₄), 7,55 (d, 1H, J _{3,4} = 4,33, H ₃), 7,89(d, 2H, J _{orto} = 8,85 e J _{meta} = 1,88, H ₁₁ e H ₁₅), 8,12 (d, 1H, J _{4,3} = 4,33, H ₄), 8,66 (sl, 1H, H ₆), 12,15 (s, 1H, H ₈)	55,40 (C ₁₆), 113,73 (C ₁₂ e C ₁₄), 124,74 (C ₃), 125,36 (C ₁₀), 129,68 (C ₁₁ e C ₁₅), 130,45 (C ₄), 140,41(C ₁₀), 146,91 (C ₂ e C ₆), 150,56 (C ₁₃), 162,23 (C ₉)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO- d_6

Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3316	ν N-H
1666	ν C=O
1608	ν C=N
1513	ν N-O assimétrico do NO_2
1434	ν C-H do anel tiofênico
1326	ν N-O simétrico do NO_2
839	ν C-Cl em <i>para</i> no aromático

COMPOSTO 16

Atribuições RMN para o composto 16

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
3,00 (s, 6H, H ₁₆ e H _{16'}), 6,76 (d, 2H, J _{orto} = 8,78, H ₁₂ e H ₁₄), 7,53 (d, 1H, J _{3,4} = 3,66, H ₃), 7,81 (d, 2H, J _{orto} = 8,78, H ₁₁ e H ₁₅), 8,13 (d, 1H, J _{4,3} = 3,66, H ₄), 8,66 (s, 1H, H ₆), 11,85 (s, 1H, H ₈)	39,60 (C ₁₆ e C _{16'}), 110,53 (C ₁₂ e C ₁₄), 118,58 (C ₃), 125,39 (C ₁₀), 128,87 (C ₁₁ e C ₁₅), 129,36 (C ₅), 130,54 (C ₄), 147,43 (C ₆ e C ₂), 150,30 (C ₁₃), 152,64 (C ₉)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO- d_6 Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3427	ν N-H e ν O-H de H_2O
1630	ν C=O
1607	ν C=N
1526	ν N-O assimétrico do NO_2
1433	ν C-H do anel tiofênico
1332	ν N-O simétrico do NO_2
815	ν C-N

COMPOSTO 17

Atribuições de RMN para o composto 17

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
5,87 (s, 2H, H ₁₆), 6,60 (d, 2H, J _{orto} = 8,05, H ₁₂ e H ₁₄), 7,51 (d, 1H, J _{4,3} = 3,66, H ₄), 7,66 (d, 2H, J _{orto} = 8,05, H ₁₁ e H ₁₅), 8,12 (s, 1H, J _{3,4} = 3,66, H ₃), 8,63 (s, 1H, H ₆), 11,83 (s, 1H, H ₈)	112,49 (C ₁₂ e C ₁₄), 118,59 (C ₁₀), 128,67 (C ₁₁ e C ₁₅), 129,59 (C ₄), 130,48 (C ₃), 138,90 (C ₂), 147,44 (C ₆), 150,22 (C ₅), 152,62 (C ₁₃), 163,20 (C ₉)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO-d_6 Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3463	ν N-H amina primária aromática
3382	ν N-H amida
1640	ν C=O
1604	ν C=N
1515	ν N-O assimétrico do NO_2
1433	ν C-H do anel tiofênico
1366	ν N-O simétrico do NO_2
842	ν C-N

COMPOSTO 18

Atribuições de RMN para o composto 18

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
6,87 (d, 2H, $J_{\text{orto}} = 8,42$ e $J_{\text{meta}} = 1,83$, H ₁₂ e H ₁₄), 7,55 (d, 1H, $J_{3,4} = 4,03$, H ₃), 7,80 (d, 2H, $J_{\text{orto}} = 8,42$ e $J_{\text{meta}} = 1,83$, H ₁₁ e H ₁₅), 8,12 (d, 1H, $J_{4,3} = 4,03$, H ₄), 8,66 (s, 1H, H ₆), 12,02 (s, 1H, H ₈)	115,02 (C ₁₂ e C ₁₄), 123,13 (C ₄), 129,13 (C ₁₁ e C ₁₅), 129,85 (C ₁₀), 130,45 (C ₃), 140,02 (C ₂), 147,02 (C ₆), 150,48 (C ₅), 160,95 (C ₁₃), 161,01 (C ₉)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO- d_6 Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3367	ν O-H fenólico
3309	ν N-H amida
1667	ν C=O
1604	ν C=N
1502	ν N-O assimétrico do NO_2
1428	ν C-H do anel tiofênico
1335	ν N-O simétrico do NO_2

COMPOSTO 19

Atribuições de RMN para o composto 19

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
7,61(d, $J_{3,4} = 4,14$, 1H, H ₃), 7,81 (d, 2H, $J_{\text{orto}} = 4,90$, H ₁₂ e H ₁₄), 8,14 (d, $J_{4,3} = 4,14$, 1H, H ₄), 8,67 (s, 1H, H ₆), 8,79 (d, 2H, $J_{\text{orto}} = 4,90$, H ₁₁ e H ₁₅)	121,48 (C ₁₁ e C ₁₅), 130,19 (C ₃), 130,42 (C ₄), 139,90 (C ₂ e C ₅), 142,34 (C ₁₀), 146,11 (C ₆), 150,38 (C ₁₂ e C ₁₄), 161,94 (C ₉)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO- d_6

Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3172	$\nu \text{ N-H amida}$
1670	$\nu \text{ C=O}$
1595	$\nu \text{ C=N}$
1527	$\nu \text{ C-H do anel tiofênico}$
1492	$\nu \text{ N-O assimétrico do NO}_2$
1435	$\nu \text{ C-H do anel tiofênico}$
1307	$\nu \text{ N-O simétrico do NO}_2$
711	$\delta \text{ C-H fora do plano do anel piridínico}$

COMPOSTO 20

Atribuições de RMN para o composto 20

RMN- ¹ H (300 MHz, δ =ppm)	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ =ppm)
7,73 (d, 2H, H ₃ e H ₁₂), 8,17 (d, 2H, J = 4,39, H ₄ e H ₁₁), 8,97 (s, 2H, J = 4,39, H ₆ e H ₉)	130,65 (C ₄ e C ₁₁), 133,48 (C ₃ e C ₁₂), 144,09 (C ₆ e C ₉), 152,90 (C ₅ e C ₁₀), 157,35 (C ₂ e C ₁₃)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO- d_6

Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

1613	$\nu \text{C}=\text{N}$
1527	$\nu \text{C}-\text{H}$ do anel tiofênico
1491	$\nu \text{N}-\text{O}$ assimétrico do NO_2
1431	$\nu \text{C}-\text{H}$ do anel tiofênico
1340	$\nu \text{N}-\text{O}$ simétrico do NO_2

APÊNDICE A

PARTE 2

Os espectros de RMN-¹H foram efetuados em espectrômetro Brucker 400 MH, em dimetilsulfóxido deuterado, e as medidas encontram-se em ppm.

*Espectro de massa obtido com varredura de íons positivos (ES+)

DBA-4/S

2,97 (s, 6H, N(CH₃)₂),
 6,72-6,74 (d, J = 8,8, 2H, H₁₂ e H₁₄),
 7,49-7,50 (d, J = 3,9, 1H, H₄),
 7,77-7,79 (d, J = 8,8, 2H, H₁₁ e H₁₅),
 8,09-8,10 (d, J = 4,2, 1H, H₃),
 8,63 (s, 1H, H₆), 11,91 (s, 1H, H₈)

DBA-4S 134 (2.674) Cm (128.202)

DBA-25/S

3,83 (s, 3H, OCH₃), 4,99 (s, 2H, NH₂),
6,89-6,91 (d, J = 8,1, 1H, H₁₂),
7,15-7,19 (m, 2H, H₁₁ e H₁₅),
7,53-7,54 (d, J = 3,9, 1H, H₄),
8,12-8,13 (d, J = 3,9, 1H, H₃),
8,64 (s, 1H, H₆), 11,99 (s, 1H, H₈)

DBA-25S 135 (2.695) Cm (121:167)

*Espectro de massa obtido com varredura de íons positivos (ES+)

APÊNDICE B

“PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE PRÓ-FÁRMACOS POTENCIALMENTE TUBERCULOSTÁTICOS”

Trabalho desenvolvido em paralelo ao trabalho de doutorado direto

A.1. INTRODUÇÃO

A.1.1. Latenciação

A latenciação (Chung, Ferreira, 1999) derivação da modificação molecular, consiste em um dos processos mais profícuos compreendendo ampla gama de processos por meio dos quais produz-se forma de transporte inativa do fármaco, que, *in vivo*, mediante processos enzimáticos e/ou químicos (Testa, Caldwell, 1996; Wermuth, 2003; Ettmayer *et al.*, 2004), libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele (Bundgaard, 1985; Bundgaard, 1991; Friis, Bundgaard, 1996) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática do conceito de pró-fármaco.

Vários são os objetivos da latenciação (Bundgaard, 1985; Bundgaard, 1991; Friis, Bundgaard, 1996; Chung, Ferreira, 1999; Testa, 2005):

- ✕ Aumento da biodisponibilidade
- ✕ Prolongamento de ação
- ✕ Seletividade de ação
- ✕ Diminuição da toxicidade
- ✕ Resolução de problemas de formulação

Os derivados obtidos com a latenciação podem ser subdivididos em pró-fármacos clássicos, bioprecursores e fármacos dirigidos (Wermuth, 1984). Formas derivadas destas englobam os pró-fármacos mistos, duplos ou em cascata, pró-fármacos recíprocos (Singh, Sharma, 1994), além de formas de liberação química (CDS) (Prokai, Prokai-Tatrai, Bodor, 2000) e de liberação altamente seletiva, como o ADEPT e o GDEPT (Bogshawl *et al.*, 1994; Melton, Knox, Connors, 1996; Duvaz, Springer, 1997).

No geral, os transportadores são desprovidos de atividade terapêutica. Nestes casos as formas latentes obtidas são os pró-fármacos clássicos (Wermuth, 2003).

Entretanto, quando o transportador também apresenta atividade, a forma latente resultante é denominada de pró-fármaco recíproco. É uma forma de latenciação vantajosa, que permite obter derivados de atividade mista ou de atividade única por mecanismos diferentes. Busca-se, desta maneira, obter sinergismo ou complementaridade de ações (Singh, Sharma, 1994).

A.1.1.1. Pró-fármacos de ação prolongada

O planejamento racional de pró-fármacos deve considerar, em geral, a existência de grupos funcionais na molécula do fármaco e do transportador e os sistemas enzimáticos passíveis de serem utilizados na biotransformação específica ou não (Friis, Bundgaard, 1996).

Entre os diferentes tipos de pró-fármacos merecem realce as classes de fármacos nas quais a administração deve ser efetuada em longos períodos de tempo. Reduzem-se, destarte, as doses e, concomitantemente, a toxicidade. É importante, no entanto, que a liberação controlada do fármaco do transportador polimérico permita que se atinja a dose mínima eficaz, sem o que não há a manifestação biológica pretendida.

Os transportadores mais utilizados com vistas a este objetivo são os polímeros (Duncan, 2003), biodegradáveis ou não, os primeiros mais empregados por suas propriedades físico-químicas e biológicas mais adequadas. As características básicas para a escolha desses transportadores são:

- ✕ ausência de toxicidade ou antigenicidade intrínseca;
- ✕ presença de grupos funcionais para a ligação dos fármacos;
- ✕ estabilidade até que se atinja o local de ação e
- ✕ incapacidade de acúmulo no organismo.

O tipo de ligação entre fármaco e polímero é, em geral, covalente, por permitir liberação lenta e gradual da porção ativa (Chung, Ferreira, 1999). No entanto, não raro, a ligação não é direta, mas feita por intermédio de grupos espaçantes, sem atividade biológica. Tais grupos podem, dependendo do comprimento e da estrutura, facilitar o acesso da enzima à ligação, permitindo a liberação do fármaco da matriz polimérica com maior facilidade. Também, permitem estabelecer a ligação entre grupos funcionais que não formariam necessariamente ligações lábeis entre si.

Várias macromoléculas podem ser utilizadas como transportadores (Schacht, Vansteenkiste, Seymour, 1996), como mostra a Tabela I. Entre elas, merecem realce a quitina e a quitosana, por se tratar de polissacarídeos de fácil obtenção e, em geral, baixa toxicidade.

Tabela I. Transportadores macromoleculares

CLASSIFICAÇÃO	EXEMPLOS
Macromoléculas Naturais	
× Proteínas	× Albumina, globulina
× Polissacarídeos	× Dextrano, quitina, quitosana, inulina
× Ácidos nucleicos	× DNA
Macromoléculas Sintéticas	
× Ácidos poliamínicos	× Polilisina, ácido poliaspártico, ácido poliglutâmico
Macroméculas Mistas	× Copolímero de anidrido estireno de ácido maléico (SMA)
	× Copolímero de anidrido éter divinilmaleico (DIVEMA)
	× Copolímero de <i>N</i> -(2-hidroxipropil)-metacrilamida (HMPA)
	× Polietilenoglicol (PEG)
	× Álcool polivinílico (PVA)

A.1.2. Quitina e Quitosana

A quitina (Sezaki, 1990), biopolímero, em geral, extraído da casca de camarão ou caranguejo, encontra-se amplamente disseminada na natureza como constituinte estrutural de plantas, animais, que incluem invertebrados marinhos, insetos, e de fungos e leveduras. Estruturalmente, a quitina é um $\beta(1\rightarrow4)$ 2-acetamido-2-desoxiglicano e a quitosana é o termo coletivo aplicado às quitinas desacetiladas em diferentes estágios de desacetilação e despolimerização (Figura 2).

Existe ampla variedade de massas moleculares para estes polímeros. Os comercializados são:

Quitina:

MM média = ~ 400.000

Quitosana:

MM baixa = ~ 150.000

MM média = ~ 400.000

MM alta = ~ 600.000

Figura 2. Fórmulas estruturais dos polímeros quitina e quitosana.

Devido à limitada solubilidade da quitina em solução aquosa, a quitosana é mais conveniente para as aplicações industriais. Ainda que o grau de desacetilação afete a solubilidade da quitosana em solução aquosa, esta é solúvel em soluções ácidas e levemente solúvel em soluções fracamente alcalinas. Soluções de dimetilformamida ou dimetilacetamida contendo sais de lítio são, muitas vezes, utilizadas como meio solvente, em reações de modificação das estruturas destes polímeros (Shigemasa *et al.*, 1999).

A quitosana é quase atóxica ($DL_{50} = 16$ g/kg de peso corpóreo) para administração oral. A dose segura de quitosana é cerca de 1 g/kg de peso corpóreo/dia para administração por via oral e cerca de 4,5 mg/kg de peso corpóreo/dia para administração intravenosa (Hirano *et al.*, 1990).

A quitosana é fonte potencial de polissacarídeos, principalmente devido à sua estrutura específica e suas propriedades. Sua natureza catiônica limita a utilização em soluções aquosas apenas em presença de ácidos em excesso visando formar sais solúveis (Heras *et al.*, 2001).

A busca de compostos mais hidrossolúveis de quitina e quitosana tem ocupado posição de destaque. Uma das razões para o problema da solubilidade da quitosana fundamenta-se na rígida estrutura cristalina e na presença do grupo amino primário e/ou acetamido, os quais têm importante papel na formação de características conformacionais estabilizadas por ligações de hidrogênio intra e/ou intermoleculares (Heras *et al.*, 2001; Zong *et al.*, 2000). A remoção dos dois átomos de hidrogênio resulta em maior solubilidade em solventes aquosos.

Derivados acilados (Kubota *et al.*, 2000), sulfonados e/ou sulfatados (Morita, Katsuraya, Hatanaka, 1999) e fosfonados (Heras, 2001) de quitosana foram sintetizados e apresentaram solubilidade em água relativamente mais alta que os compostos de origem.

Exemplo de derivado altamente solúvel em água é a *N*-metilenofosfono quitosana, NMPQ (Figura 3).

Figura 3. Estrutura do NMPQ, derivado hidrossolúvel da quitosana.

Tabela II. Solubilidade da quitosana e do NMPQ (Heras *et al.*, 2001)

Solvente	Quitosana	NMPQ
Água	insolúvel	solúvel (imediatamente)
NaOH (1%)	insolúvel	gel de baixa viscosidade
HCl (1%)	intumescimento	solúvel (imediatamente)
Ácido acético (1%)	solúvel (após 1 h)	solúvel (imediatamente)
Dimetilformamida	intumescimento	gel de alta viscosidade
Dimetilsulfóxido	insolúvel	insolúvel
Etanol	insolúvel	gel de baixa viscosidade

Nos últimos vinte anos, numerosas novas aplicações para a quitina e a quitosana têm sido encontradas nas indústrias agrícola (antiviral agrícola, aditivo em fertilizantes), cosmética, têxtil, farmacêutica e alimentícia. Várias publicações exploram o potencial destes polímeros como fibras dietéticas, ingredientes de produtos para pele e cabelos, suturas, agentes hipocolesterolêmico, hemostático (*N*-hexanoil e *N*-octanoil), anticoagulantes (*N*-acetilquitosanas-*O*-sulfatadas), cicatrizantes e até mesmo uma lipoproteína liberadora de lipase (quitosana sulfatada) (Weiner, 1992), além de utilizações futuras como transportadores e/ ou matrizes para sistemas de liberação de fármacos.

Característica interessante destes polímeros é sua capacidade de estimular a migração de células mononucleares e polimorfonucleares. Esta atividade é muito estudada e bastante vantajosa para utilizações médico-farmacêuticas (Weiner, 1992).

Estudos histológicos mostram, ainda, que estes biopolímeros também aceleram a recuperação de tecido conjuntivo e estimulam a angiogênese. Estas características têm estimulado estudos visando à utilização de membranas de quitosana como agentes cicatrizantes em queimaduras (Hirano *et al.*, 1991).

Alguns derivados de quitina e quitosana têm demonstrado capacidade de regulação da produção do fator de necrose tumoral, de interleucina-1 e do fator estimulante de colônias por macrófagos, além de induzir efeitos imunológicos adjuvantes (Shibata, Metzger, Myrvik, 1997).

A quitosana pode atuar como agente ativador de macrófago por meio da mobilização de ácido araquidônico. Estudo recente da Universidade da Califórnia mostrou que células marcadas com ácido araquidônico triciado, quando expostas a diferentes concentrações de quitosana e em determinados períodos de tempo, apresentam mobilização do ácido araquidônico de forma dose/tempo dependente (Figura 4) (Bianco *et al.*, 2000).

Figura 4. Estimulação da liberação de ácido araquidônico por quitosana em macrófagos P388D₁.
Fonte: Bianco *et al.*, 2000

Este mesmo estudo sugeriu que esta mobilização de ácido araquidônico ocorreria mediante ação da quitosana sobre um receptor denominado PLA₂ do citosol da célula. Este receptor está envolvido na mobilização celular de ácido araquidônico pelo fator de ativação plaquetária (PAF). Concluiu-se, assim, que a quitosana possui propriedades pró-inflamatórias similares às aquelas apresentadas pelo PAF.

Também é reconhecida a existência de uma família de enzimas quitinolíticas expressas por macrófagos, chamadas, genericamente, de quitinases. Tem sido detectada em placas ateroscleróticas, no sangue e em tecidos de cobaias infectados com *Aspergillus fumigatus*. Sua função fisiológica é desconhecida, mas acredita-se que, por ser a quitina um componente de parede celular de fungos, a função desta enzima esteja correlacionada com a defesa do organismo (Renkema, 1995; Tjoelker *et al.*, 2000).

Outra possibilidade é sugerida pela observação de que subgrupos de macrófagos carregadores de lipídios, em lesões ateroscleróticas, expressam a enzima. Alguns autores especulam que a enzima possa modular a matriz extracelular das paredes dos vasos e, assim, afetar o fluxo sanguíneo no tecido, remodelando eventos associados com a aterogênese (Tjoelker *et al.*, 2000).

A.2. OBJETIVOS

Com vistas à necessidade de novas abordagens terapêuticas e medicamentos para doenças como a tuberculose, a proposta deste trabalho desenvolvido paralelamente ao projeto de doutorado direto foi explorar a possibilidade de desenvolver pró-fármacos poliméricos da isoniazida e, num segundo momento, extrapolar tais estudos para a obtenção de pró-fármacos poliméricos dos análogos da biblioteca que apresentassem melhores atividades biológicas.

Esses pró-fármacos potenciais poderiam levar à liberação prolongada dos compostos na corrente sanguínea e, portanto, ao prolongamento de sua atividade com conseqüente diminuição de doses e possível diminuição de toxicidade, principalmente para os nitroderivados.

A.3. MATERIAIS E MÉTODOS

A.3.1. Materiais

A.3.1.1. Reagentes

- × ácido acético (Merck)
- × ácido clorídrico (Merck)
- × ácido fórmico (Merck)
- × ácido fosforoso (Aldrich)
- × ácido sulfúrico (Nuclear CAQ – Casa da Química)
- × anidrido succínico (Vetec Química Fina Ltda)
- × carbonato de potássio (Synth)
- × cloreto de tionila (Fluka)
- × dícicloexilcarbodiimida (DCC) (Merck)
- × dietilenoglicol (Merck)
- × dimetilaminopiridina (DMAP) (Aldrich)
- × formaldeído (Merck)
- × hidróxido de sódio (Merck)
- × isoniazida (FURP)
- × pentóxido de fósforo (CARQ – Cromato)
- × piridina (Synth)

- × quitina (Universidade Federal do Rio Grande do Norte)
- × quitosana (Universidade Federal do Rio Grande do Norte)

A.3.1.2. Solventes

- × acetato de etila (Merck)
- × acetona (Merck)
- × clorofórmio (CARQ – Cromato, Merck)
- × diclorometano (CARQ- Cromato)
- × dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth)
- × dioxano (Merck)
- × etanol (Merck)
- × éter etílico (Merck)
- × metanol (Merck)
- × *N,N*-dimetilformamida (DMF) (Nuclerar CAQ – Casa da Química)
- × *n*-octanol (Merck)
- × tetraidrofurano (Merck)

A.3.1.3. Solventes deuterados

- × clorofórmio deuterado (CDCl_3) (Aldrich, Isotec Inc)
- × água deuterada (D_2O) (Isotec Inc)
- × dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6) (Aldrich, Merck, Isotech Inc)
- × padrão interno – tetrametilsilano (TMS) (Sigma)

A.3.1.4. Membranas

- × membrana para diálise em acetato de celulose 12.400 Da, com 49 mm de diâmetro (Sigma)

A.3.2. Métodos

A.3.2.1. Síntese

A.3.2.1.1. Síntese dos pró-fármacos poliméricos de isoniazida (Shigemasa *et al.*, 1999)

A.3.2.1.1.1. Síntese dos hemissuccinatos de quitina e quitosana (Yamaoka, Roberts, Stella, 1983)

Em balão contendo o polímero (0,33 mol de OH) dissolvido em DMF e a 90 °C adicionou-se, sob agitação, 0,33 mol de piridina, seguidos de 0,33 mol de anidrido succínico. A agitação e o aquecimento foram mantidos por 30 horas. A mistura reacional foi transferida para a membrana de diálise em acetato de celulose seletiva para massa molecular de 12.400 Da, com 49,0 mm de diâmetro, e dialisada contra água destilada. A diálise foi mantida até que o pH do solvente de diálise fosse constante após sucessivas trocas. Ao término da diálise, o produto foi submetido à liofilização por 24 h.

Figura 5. Succinoilação dos polímeros.

A.3.2.1.1.2. Síntese dos pró-fármacos de ação prolongada de isoniazida

Suspendeu-se o hemissuccinato de quitina ou quitosana, sob agitação magnética, em DMF e, a esta suspensão, adicionou-se a isoniazida, DCC [proporção de 1(polímero, com base no número de mol de COOH livre):3 DCC, em pequeno volume de diclorometano. Manteve-se sob agitação, à temperatura ambiente, por 4 horas. Em seguida, adicionou-se mais DCC (mesma proporção anterior), mantendo-se a agitação à temperatura ambiente por, no mínimo, 30 horas. O produto final foi dialisado contra água destilada em membrana de acetato de celulose (*cut off* 12.400 Da), de 49,0 mm de diâmetro, até pH constante. A solução dialisada foi liofilizada por 24 horas, obtendo-se o pró-fármaco purificado.

Figura 6. Obtenção do pró-fármaco polimérico de isoniazida.

A.3.2.1.2. Síntese dos pró-fármacos poliméricos hidrossolúveis de isoniazida

A.3.2.1.2.1. Síntese do derivado *N*-metilenofosfônico – NMFQ (Heras et al., 2001)

Preparou-se solução de quitosana a 2% (p/v) em ácido acético glacial 1% (v/v). Uma parte (em peso) desta solução de quitosana foi colocada em balão de fundo redondo e uma parte de ácido fosforoso (em peso) dissolvido em água foi adicionada, gota a gota, sob agitação durante 1 hora. Elevou-se, então, a temperatura do meio reacional a 70 °C e uma

parte (em peso) de formaldeído 36,5% (p/V) foi adicionada, lentamente, por 1 hora, sob refluxo. O aquecimento foi mantido a 70 °C, durante 6 horas. Uma solução amarelo-claro resultante foi dialisada contra água destilada, em membrana de acetato de celulose (*cut off* 12.400 Da), de 49,0 mm de diâmetro, por 48 horas ou até que o pH da água de diálise subisse a 6,8. A solução dialisada foi liofilizada por 24 horas, obtendo-se o pró-fármaco purificado.

Figura 7. Obtenção do NMPQ.

A.3.2.1.2.2. Síntese do hemissuccinato da *N*-metilenofosono quitosana

Esta succinoilação foi realizada utilizando-se a metodologia descrita no item A.3.2.1.1.1.

Figura 8. Succinoilação da *N*-metilenofosono quitosana.

A.3.2.1.2.3. Acoplamento do hemissuccinato de NMQF com isoniazida

Suspendeu-se o hemissuccinato de *N*-metilenofosono quitosana (1 mmol de OH livre) em DMF e, adicionaram-se, sob agitação, 5 mmol de DMAP e a 14,6 mmol de DCC (Lui, Xie, 1987) dissolvidos em pequena quantidade de diclorometano. Manteve-se a agitação à temperatura ambiente por 4 horas, quando, então, adicionou-se a isoniazida (10 mmol). Após 30 horas de agitação à temperatura ambiente, a mistura reacional foi transferida para

membrana de acetato de celulose e dialisada contra água destilada por 3 dias e, então, liofilizada.

Figura 9. Reação para obtenção do derivado hidrossolúvel por meio do hemissuccinato de *N*-metilenofosono quitosana.

A.3.2.1.3. Síntese da succinilisoniazida

Foram testadas duas metodologias sintéticas, descritas como segue.

A.3.2.1.3.1. Metodologia I (Greene, Wuts 1981)

Em um balão contendo a isoniazida (10 mmol) suspensa em clorofórmio anidro, adicionou-se o anidrido succínico (10 mmol) sob agitação. Elevou-se a temperatura a 70 °C mantendo-se a reação sob refluxo por 4 horas. Obteve-se sólido suspenso, que foi filtrado a vácuo e lavado com água destilada. O produto foi secado em bomba de alto vácuo e mantido em dessecador contendo pentóxido de fósforo.

A.3.2.1.3.2. Metodologia II

Em um tubo de ensaio adicionou-se a isoniazida (10 mmol) e o anidrido succínico (10 mmol) suspensos em THF anidro. Submeteu-se a mistura reacional a ultrassom por 30

minutos e obteve-se um sólido branco, o qual foi filtrado, lavado com água e secado em bomba de alto vácuo. O produto foi mantido em dessecador contendo pentóxido de fósforo.

Figura 10. Succinoilação da Isoniazida (composto 7).

A.3.2.1.4. Síntese do 1- (piridino-4-carbonil)-tetraidro-piridazin-3,6-diona

A um balão de duas bocas contendo a succinilisoniazida (10 mmol) suspensa em THF, adicionou-se cloreto de tionila (10 mmol), lentamente e sob agitação. A reação foi mantida à temperatura ambiente por 9 horas e acompanhada por cromatografia em camada delgada a cada 2 horas, utilizando-se como fase móvel CCl_3/MeOH (2:1) e iodo como agente revelador. Obteve-se um sólido castanho claro, o qual foi filtrado, lavado com éter etílico e, então, secado em bomba de alto vácuo para render o produto cíclico protonado. Esta reação foi realizada também em outros solventes como a DMF e o dioxano.

Figura 11. Obtenção do(s) derivado(s) cíclico da succinilisoniazida.

A.3.2.1.5. Síntese do derivado hidrossolúvel polimérico da isoniazida

Em balão contendo o polímero (1 mmol de OH livre) suspenso em DMF e a 90 °C, adicionou-se, sob agitação, 1 mmol de piridina seguido de 1 mmol de anidrido succínico. Manteve-se a agitação e o aquecimento por 24 horas. Transferiu-se, então, a mistura reacional para membrana de acetato de celulose seletiva para massa molecular de 12 400 Da, com 49 mm de diâmetro e dialisou-se a solução contra água destilada por 3 dias. A solução foi, então, transferida para um balão e liofilizada.

Figura 12. Obtenção do pró-fármaco polimérico hidrossolúvel de isoniazida.

A.3.2.2. Análises dos Compostos obtidos

A.3.2.2.1. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^1H

Os espectros de ressonância magnética de hidrogênio (^1H RMN) e de carbono (^{13}C RMN) foram obtidos em aparelho Bruker DPX₃₀₀ (300MHz), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Devido a problemas com o PROBE normal, as análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas utilizando-se PROBE inverso.

A.3.2.2.2. Espectrofotometria de absorção no infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro FTIR Bomem, no Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A.3.2.2.3. Faixas de Fusão

A determinação das faixas de fusão dos compostos sintetizados foi realizada em tubo capilar, em aparelho Büchi, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

A.3.2.3 Diálise

Os derivados obtidos foram dialisados em membrana de acetato de celulose seletiva para massa molecular de 12 400 Da, com 49 mm de diâmetro.

A.3.3.3 Liofilização

A liofilização dos derivados obtidos foi efetuada em liofilizador Christ xxx, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

A.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quitosana e a quitina utilizada no trabalho foi cedida pelo Professor Doutor Marconi Ginani, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em Natal, responsável pelo grupo que realizou a extração e caracterização desses polissacarídeos.

A quitina e a quitosana possuem massa molecular média de $1,88 \times 10^5$, determinada a partir da viscosidade em reômetro com aplicação da equação de Mark-Howink.

O grau de desacetilação estimado para a quitosana foi de 82,8%, mediante emprego de espectroscopia no infravermelho e confirmação por meio de monitoramento da banda de *N*-acetil em espectros de ressonância magnética nuclear.

Foram realizadas duas abordagens a fim de se obter os derivados poliméricos. Na primeira etapa, trabalhou-se diretamente com os polímeros quitina e quitosana. Posteriormente, frente à dificuldade de caracterização dos derivados obtidos, utilizou-se como transportador derivado hidrossolúvel de quitosana – o derivado *N*-metilenofosfônico (NMPQ) (Heras *et al.*, 2001).

Os primeiros estudos foram realizados com isoniazida para se testar as reações de acoplamento dos transportadores quitina e quitosana por meio de espaçante succínico.

Destes estudos resultaram várias derivações de rotas sintéticas e reagentes utilizados. Estes resultados serão discutidos a seguir no item A.4.1.

A.4.1. Obtenção dos pró-fármacos por meio do uso direto de quitina e de quitosana

Tabela III. Dados de RMN para os derivados poliméricos

Produto	^1H -RMN (300 MHz, D_2O , δ = ppm)	^{13}C -RMN (300 MHz, D_2O , δ = ppm)
Composto 1	1,78 e 1,92 (s, 2,44H, CH_3 unidades acetiladas) 2,35 (m, 16,59H, $\text{H}_{7,7'}$ e $\text{H}_{8,8'}$); 3,47 – 3,58 (m, 20,89H, H_2 – H_6); 4,50 (d, 1,00 H, H_1)	Não obtido ^b
Produto	^1H -RMN (300 MHz, DMSO-d_6 , δ = ppm)	^{13}C -RMN (300 MHz, DMSO-d_6 , δ = ppm)
Composto 2	2,08 (s, 1,88H, H_{10}); 2,73 (d, 2,63H, H_8); 2,95 (d, 2,57H, H_7); 3,35 (m, ^a , H_2 – H_6)	Não obtido ^b
Composto 3	2,08 (s, 1,88H, H_{20}); 2,73 (s, 4,01H, H_8); 2,89 (s, 4,01H, H_9); 3,15-3,60 (m, ^a , H_2 – H_6); 5,60(d, 2,58H, H_1); 7,71 (sl, 2,56H, H_{14} e H_{17}), 7,93 (s, 2,00H, H_{15} e H_{16})	26,18 (C_9) 26,62 (C_8) 48,35 (C_2) 122,49 (C_{14} e C_{17}) 150,93 (C_{15} e C_{16}); 157,50 (C_{10}) 162,97 (C_{13})
Composto 4	2,85 (s, 3,24H, H_8); 3,01 (s, 3,24H, H_9); 3,15-3,60(m, ^a , H_2 – H_6); 5,72 (s, 5,07H, H_1); 7,84 (s, 1,98H, H_{14} e H_{17}), 8,81 (d, 2,00H, H_{15} e H_{16})	25,31 (C_9) 26,18 (C_8) 34,20 (C_2) 121,85 (C_{14} e C_{17}) 151,06 (C_{15} e C_{16}) 157,50 (C_{10}) 162,97 (C_{13})

^a superposição com água do solvente deuterado, ^b baixa solubilidade no solvente deuterado, não sendo possível a aquisição

Os pró-fármacos foram obtidos com êxito, como comprovam as atribuições da tabela III. É importante ressaltar que, por esta metodologia, obtém-se a quitosana acilada também no NH₂, posição esta muito mais favorável que as hidroxilas do anel sacarídico.

A estimativa do grau de succinoilação dos polímeros foi efetuada mediante técnica de RMN-¹H (Sezaki, 1990; Shigemasa *et al.*, 1999), segundo a fórmula:

$$GS = \frac{\text{número de grupos substituídos}}{\text{número de resíduos monossacarídicos}}$$

em que GS é o grau de succinoilação.

Desta maneira, obtiveram-se como resultados:

- × GS quitina – 1,30
- × GS quitosana – 2,07

Os principais problemas enfrentados relacionam-se à solubilidade dos polímeros. Estes são pouco solúveis em solventes orgânicos e levemente solúveis em solução aquosa de ácido clorídrico (pH 4–5), o que, por vezes, impossibilita a caracterização do polímero e de seus produtos. Desta maneira, as atribuições para os espectros de RMN-¹H e de RMN-¹³C foram realizadas por meio de análise de mais de um espectro obtido para a mesma amostra. A numeração das estruturas abrange apenas os átomos para os quais foi possível realizar atribuição.

Os intermediários succinoilados apresentaram solubilidade em água relativamente maior que a dos polímeros de partida devido aos grupos carboxila da cadeia lateral. Ainda assim, a determinação estrutural e do grau de substituição teve que ser baseada, quase completamente, em análises de RMN realizadas ou em D₂O/HCl, ou em DMSO-d₆. Tentou-se produzir o sal destes derivados, mas sua solubilidade em água não aumentou consideravelmente.

Para estes compostos, não foi possível a obtenção de um espectro de carbono 13 devido à baixa solubilidade destes nos solvente deuterados, além do fato de se estar utilizando PROBE inverso.

Apesar destes problemas, pôde-se verificar que a obtenção dos pró-fármacos é perfeitamente possível sob estas condições e passível de otimização.

A.4.2. Obtenção dos pró-fármacos hidrossolúveis de quitosana

COMPOSTO 5

Tabela IV. Atribuições de RMN para o composto 5

RMN- ¹ H (300 MHz, δ = ppm)
2,62 (s, 1H, H ₁₀),
3,40 – 3,66 (m, 6,0 H, H ₇ (I*), H ₇ (II*), H ₂ (I), H ₂ (II)),
4,31 – 4,58 (m, 5,7 H, H ₃ – H ₆),
5,24 (sl, 1H, H ₁ (I)),
5,56 (sl, 1H, H ₁ (II)),
6,43 (s, **, H ₁₁),
8,51 (s, **, H ₉)

*I = monossubstituído, II = dissubstituído, ** integração comprometida devido à troca com o deutério do solvente

RMN-¹H, 300 MHz, D₂O, 70 °C

COMPOSTO 6

Tabela V. Atribuições de RMN para o composto 6

RMN- ¹ H (300 MHz, δ = ppm)
2,70 (s, 1,7 H, H ₁₀),
3,15 (sl, 4H, H ₁₂ e H ₁₃),
3,40 – 3,66 (m, 12,6 H, H ₇ (I) e (II), H ₂ (I) e (II),
4,21 – 4,64 (m, 14,5 H, H ₃ – H ₆),
5,26 (sl, 2,5 H, H ₁ (I)),
5,55 (sl, 1,9 H, H ₁ (II))

RMN-¹H, 300 MHz, D₂O, 70 °C

COMPOSTO 7

Tabela VI. Atribuições de RMN para o composto 27.

RMN- ¹ H (300 MHz, δ= ppm) DMSO-d ₆	RMN- ¹ H (300 MHz, δ= ppm) D ₂ O	RMN- ¹³ C (75 MHz, δ= ppm) DMSO-d ₆
3,36(d, 1H, H ₇), 7,78 (d, 2H, H ₂ e H ₆), 8,77 (d, 2H, H ₃ e H ₅), 10,06 (s, 1H, H ₉), 10,66 (s, 1H, H ₈), 11,74 (sl, 1H, H ₁₄)	2,76 (s, 4H, H ₁₁ e H ₁₂), 7,96 (d, 2H, H ₃ e H ₅), 8,84 (d, 2H, H ₂ e H ₆)	28,05 e 28,66 (C ₁₁ e C ₁₂), 121,23 (C ₃ e C ₅), 139,42 (C ₄), 150,30 (C ₂ e C ₆), 163,82 (C ₇), 170,39 (C ₁₀), 173,44 (C ₁₃)

RMN-¹H, 300 MHz, DMSO-d₆

As atribuições para os hidrogênios H₈ e H₉ podem estar trocadas.

RMN- ^1H , 300 MHz, D_2O RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO-d_6

Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3214	ν N-H
1708	ν C=O ácido
1608	ν C=O hidrazida e da amida (C_7 e C_{10})
1500	ν N-C=O
1474 – 1411	ν C-N e HC=CH aromático

COMPOSTO 8

Tabela VII. Atribuições de ressonância magnética nuclear para o composto 8.

RMN- ^1H (300 MHz, δ = ppm)	RMN- ^1H (300 MHz, δ = ppm)	RMN- ^{13}C (75 MHz, δ = ppm)
DMSO- d_6	D_2O	DMSO- d_6
8,15 (d, 2H, H_2 e H_6), 8,99 (d, 2H, H_3 e H_5), 10,23 (s, 1H, H_9), 11,02 (s, 1H, H_1)	2,94 (m, 4H, H_{11} e H_{12}), 8,39 (d, 2H, H_3 e H_5), 9,03 (d, 2H, H_2 e H_6)	28,03 e 28,65 (C_{11} e C_{12}), 123,56 (C_3 e C_5), 143,99 (C_4), 145,83 (C_2 e C_6), 162,30 (C_7), 170,28 (C_{10}), 173,39 (C_{13})

RMN- ^1H , 300 MHz, DMSO-d_6 RMN- ^1H , 300 MHz, D_2O

RMN- ^{13}C , 75 MHz, DMSO- d_6

Infravermelho, KBr, 400-4000 cm^{-1}

3179	$\nu \text{ N-H}$
1727	$\nu \text{ C=O}$ carbonila (C_8)
1605	$\nu \text{ C=O}$ carbonilas (C_7 e C_{11})
1513 – 1407	$\nu \text{ C-N}$ e HC=CH aromático

COMPOSTO 9

Tabela VIII. Atribuições de RMN-¹H para o composto 9

RMN- ¹ H (300 MHz, δ = ppm)
1,98 ou 2,40 – 2,54 (sl ou m, 20 H, H ₈ *),
2,40 – 2,54 (m, 4H, H ₉ e H ₁₀),
3,18 – 3,66 (m, 23 H, H ₂ e H ₇),
4,25 – 4,59 (m, 30 H, H ₃ – H ₆),
5,26 (sl, 5 H, H ₁ (I)),
5,57 (sl, 3 H, H ₁ (II)),
8,46 (d, 2 H, H ₁₁ e H ₁₄),
9,41 (d, 2 H, H ₁₂ e H ₁₃)

* diferentes deslocamentos para a metila devido à presença de diferentes unidades acetiladas.

RMN-¹H, 300 MHz, D₂O, 70 °C

Embora seja possível obterem-se os pró-fármacos por meio da utilização direta dos polímeros quitina e quitosana, a dificuldade de caracterização de tais produtos levou-nos a optar pelo uso de um grupo solubilizante no transportador.

O derivado *N*-metilenofosfônico da quitosana (NMPQ) foi obtido com relativa facilidade e em bom rendimento em massa (1,05 g a partir de 0,5 g de quitosana). Este derivado é prontamente solúvel em água, permitindo melhor caracterização.

O espectro de RMN-¹H foi realizado a 70 °C, a fim de se diminuir a viscosidade da solução do mesmo em D₂O. Os sinais em δ 5,24 e 5,57 foram atribuídos aos hidrogênios H₁ do anel sacarídico da quitosana monossustituída (I) e dissustituída (II) em seu grupo NH₂. Segundo Heras *et al.* (2001), o rendimento de cada um destes derivados pode ser estimado pela proporção entre as integrais obtidas para estes dois picos. Assim:

Tabela IX. Cálculo da proporção entre NMPQ monossustituído e dissustituído.

δ (ppm)	Produto	Integral	$\Sigma H_1 = 100\%$	%
5,24	monossustituído	0,6	0,9	66,67
5,56	dissustituído	0,3		33,33

Os sinais em δ 6,43 e 8,51 foram atribuídos aos hidrogênios dos grupos amínicos e amídicos, respectivamente, presentes nas unidades não-sustituídas e monossustituídas do polímero.

O derivado NMPQ succinoilado foi obtido por meio de rota reacional semelhante à utilizada para a succinoilação dos polímeros não-fosfonados. O rendimento em massa para esta reação foi de 0,88 g a partir de 0,5 g de NMPQ.

Contrariando as expectativas, a solubilidade destes derivados em água diminuiu com relação à obtida para o material de partida. Ainda assim, foi possível a obtenção de espectro de RMN-¹H de boa resolução. Um sinal em δ 3,15 revela a presença dos hidrogênios metilênicos do grupo succinoíla.

A etapa posterior seria a obtenção do pró-fármaco, propriamente dita, mediante reação do polímero modificado com o fármaco, no caso, a isoniazida, em presença de um catalisador de acilação (DMAP) e de um agente condensante (DCC), em meio de DMF.

Contudo, esta proposta sintética não se mostrou adequada, uma vez que não se obteve o pró-fármaco, mas sim produtos provenientes, possivelmente, da reação da DCC com o grupamento fosfônico presente no polímero, em analogia ao observado com o DMSO e um grupo alcoólico.

A utilização de DMSO como agente oxidante de álcoois é bastante conhecida e aplicada na química orgânica (Smith, 1994). O mecanismo proposto para esta reação se

baseia no ataque nucleofílico do oxigênio do DMSO ao carbono carbinólico do álcool. Entretanto, para que esta reação ocorra, o oxigênio do DMSO deve deslocar a hidroxila alcoólica, a qual é, intrinsecamente, um grupo abandonador ruim. A solução encontrada foi funcionalizar o DMSO através de reação prévia com DCC, a qual gera grupo abandonador melhor que a hidroxila. Esta reação é conhecida como oxidação de Moffatt e o mecanismo de reação entre o DMSO e o DCC segue na Figura 13.

Figura 13. Reação entre DMSO e DCC.

Fonte: Smith, 1994.

Como mencionado anteriormente, reação semelhante pode ter ocorrido com o fósforo acoplado à quitosana, competindo com a reação desejada para a obtenção do pró-fármaco. Esta proposição é reforçada pelo fato de compostos de fósforo também formarem ilidas e serem capazes, assim como o enxofre, de estabilizá-las por meio de seu orbital d.

Supõe-se que o ataque nucleofílico ao fósforo, de maneira equivalente ao enxofre (intermediário I), seja realizado pela hidroxila da cadeia succínica ligada ao polímero e/ou por moléculas de água provenientes ou da reação de produção do polímero (a qual pode ocorrer em menor escala e simultaneamente à de produção de ilida) ou da água de diálise. Esta última hipótese, em particular, foi formulada com base no fato de que, quando imersa na água de diálise, a mistura reacional alterou sua coloração de acizentado para azulada.

Foram isoladas duas frações de diferentes aspectos, para as quais os espectros de ressonância magnética de hidrogênio não indicaram a presença do pró-fármaco.

Contrariamente ao esperado, obteve-se um sólido de coloração azulada, cujo espectro de RMN-¹H evidencia ser um derivado do DCC que não a esperada dicicloexiluréia (DCU).

A segunda fração manteve o aspecto do polímero de partida. Contudo, mostrou-se quase que completamente insolúvel em água evidenciando, assim, a perda ou modificação do agente solubilizante (PO₃H₂).

É provável que a reação entre o DCC e o fósforo do grupo solubilizante seja predominante, uma vez que o pró-fármaco desejado não foi isolado. Entretanto, não é possível afirmar que a reação proposta para sua síntese não tenha ocorrido, ainda que em baixa proporção, difícil de ser identificada em polímero de baixíssima solubilidade.

A fim de se concluir a proposta inicial de obtenção do pró-fármaco hidrossolúvel de isoniazida, formulou-se nova abordagem sintética.

Uma vez que não poderíamos utilizar DCC como agente condensante para a reação de acoplamento do polímero succinilado e da isoniazida, partimos, então, para a síntese da isoniazida succinilada e posterior obtenção de seu derivado cíclico succinimídico, mais reativo que o derivado acíclico.

A succinilação da isoniazida foi realizada por duas metodologias sintéticas:

- ✱ via refluxo em clorofórmio por 4 horas (metodologia I), e
- ✱ via aplicação de ultrassom (metodologia II).

Ambas as metodologias forneceram a isoniazida succinilada (composto 7) em bons rendimentos (92,44, e 80,99% para as metodologias I e II respectivamente), entretanto, a utilização do ultrassom é visivelmente vantajosa devido a diminuição significativa do tempo de reação (de 4 horas para 40 minutos).

Os espectros de RMN-¹H e ¹³C obtidos para este composto confirmam sua estrutura juntamente com o espectro obtido no infravermelho (1708 cm⁻¹, νC=O de ácido e 1608 cm⁻¹, νC=O de hidrazida e de amida).

Para a síntese do composto cíclico (composto 8 e/ou 8'), agitou-se, à temperatura ambiente e por 9 horas, a succinilisoniazida com cloreto de tionila, objetivando-se a produção do cloreto de ácido e posterior ciclização por ataque nucleofílico de um dos nitrogênios do grupamento hidrazida ao carbono carbonílico, com conseqüente deslocamento do cloro e formação do respectivo cloridrato.

A análise dos espectros de RMN-¹H e, particularmente, de ¹³C, obtidos para este compostos suscitou muitas dúvidas devido à sua grande semelhança com os espectros obtidos para o material de partida. Apesar de terem sido identificados os mesmos sinais em ambos os compostos, as principais diferenças entre estes espectros residem, apenas, nos deslocamentos químicos. Tal fato poderia ser ocasionado por estar o composto 8 sob a forma de cloridrato.

Considerando-se, por outro lado, a ciclização, esta poderia ocorrer por meio do ataque de qualquer dos dois nitrogênios presentes na estrutura do composto 7, produzindo ciclos de cinco (composto 8') ou de seis (composto 8) membros, como ilustrado na figura 11 do item Materiais e Métodos.

Os espectros no IV indicaram alterações estruturais principalmente quando da análise da banda de estiramento de carbonila de ácido (1708 cm^{-1}) presente no composto 7, a qual não foi encontrada para o composto 8 / 8'. Para este obteve-se uma banda em 1727 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao estiramento C=O do produto cíclico.

Os deslocamentos químicos dos grupos carbonila do material de partida foram determinados por espectroscopia de RMN- ^1H . O grupo carbonila da hidrazida foi identificado em δ próximo a 160. Este valor está de acordo com o reportado na literatura para a isoniazida (δ 160). Já o grupo carbonílico ácido exibe deslocamento químico a 170 ppm, bem como a carbonila de amida. Entretanto, o primeiro possui o grupo carbonílico mais desprotegido e, por esta razão, exibe deslocamento químico maior que as demais carbonilas.

Determinados estes sinais e com o objetivo de se provar a obtenção do produto ciclizado, realizou-se a aquisição de espectro 2-D HMBC com J_2 de 5 Hz, tanto para o produto cíclico quanto para a succinilisoniazida.

A análise do espectro obtido para a succinilisoniazida (composto 7) mostra o acoplamento dos prótons nos nitrogênios 8 e 9 aos carbonos carbonílicos 7 e 10, respectivamente (Figura 13). Também é possível identificar o acoplamento entre os carbonos C_{10} e C_{13} aos hidrogênios H_{11} e H_{12} .

Figura 13. HMBC do composto 7 com J_2 de 5 Hz.

Para o composto 8, obteve-se apenas o acoplamento do hidrogênio H_9 ao carbono C_{10} (Figura 14), não sendo visualizado acoplamento entre o sinal em δ 11,02 ppm com qualquer carbono do espectro. Desta maneira, esse sinal foi atribuído ao hidrogênio do cloridrato.

Figura 14. HMBC do composto 8 com J_2 de 5 Hz.

O espectro mostra a presença de três diferentes grupos carbonílicos, o que só pode ser possível pela formação do derivado cíclico de seis membros, aquele que possui estrutura assimétrica (Figura 15). Pela mesma razão, a obtenção do análogo com anel de seis membros (composto 8) é confirmada pela presença de dois deslocamentos químicos diferentes para os carbonos C_{11} e C_{12} . Caso tivesse sido obtido o análogo de anel de cinco membros (composto 8'), estes carbonos seriam equivalentes e apenas um sinal seria observado para os dois átomos.

Figura 16. Dois possíveis análogos obtidos da ciclização do composto 7.

Finalmente, o pró-fármaco foi sintetizado pela reação entre o NMPQ e o composto 8. Um sólido amarelo claro prontamente solúvel em água foi obtido em bons rendimentos (0,021 g de 0,039 g de NMPQ). O espectro de RMN-¹H confirma a estrutura desejada (H₁₁ e H₁₄, δ 8,46; H₁₂ e H₁₃, δ 9,41).

Essa parte do trabalho resultou no artigo:

- Rando, D. G., Brandt, C. A., Ferreira, E. I. Use of *N*-methylene phosphonic chitosan to obtain an isoniazid prodrug. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 40, n.3, p.335-344, 2004.

A.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIANCO, I. D., BALSINDE, J., BELTRAMO, D. M., CASTAGNA, L. F., LANDA, C. A., DENNIS, E. A. Chitosan-induced phospholipase A2 activation and arachidonic acid mobilization in P388D1 macrophages. *FEBS Letters*, Amsterdam, v. 6, p. 292-294, 2000.
- BOGSHAWL, K. D., SHARMA, S.K., SPRINGER, C. J., ROGERS, G. T. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) *Ann. Oncol.*, Dordrecht, 5, p. 879-891, 1994.
- BUNDGAARD, H., Ed. *Design of prodrugs*. Amsterdam: Elsevier, 1985.
- BUNDGAARD, H., Novel chemical approaches in prodrug design. *Drugs Fut.*, Barcelona, v. 16, n. 5, p. 443-453, 1991.
- CHUNG, M.C., FERREIRA, E.I., O processo de latenciação no planejamento de fármacos. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 22, n.1, p.75-84, 1999.
- DUNCAN, R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 2, p. 347-360, 2003.
- DUVAZ, N.; SPRINGER, C. J. Antibody enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review. *Adv. Drug Delivery Rev.*, v.26, p.151-172, 1997.
- ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.*, v. 47, p. 2393-2404, 2004.
- FRIIS, G. J., BUNDGAARD, H. Design and applications of prodrugs. In: KROGSGAARDLARSEN, P., LILJEFORS, T., MADSEN, U., eds. *A textbook of drug design and development*, 2nd ed. Harwood Academic, Langhorne, 1996, p. 351-385.
- GREENE, T. W., WUTS, P. G. M. *Protective groups in organic synthesis*. 3rd ed., New York: Wiley, p. 564-565, 1999.
- GREGORIADIS, G., Ed. *Drug carriers in biology and medicine*. London: Academic Press, 1979.

- HERAS, A, RODRÍGUEZ, N.M., RAMOS, V.M., AGULLÓ, E. *N*-methylene phosphonic chitosan: a novel soluble derivative. *Carbohydr. Polym.*, Amsterdam, v. 44, p. 1–8, 2001.
- HIRANO, S., HIROCHI, K., HAYASHI, K. J., MIKAMI, T., TACHIBANA, H. Cosmetic and pharmaceutical uses of chitin and chitosan. In: GEBELEN, C.G., CHENG, T. C., YANG, V. C., Eds. *Cosmetic and pharmaceutical applications of polymers*. New York: Plenum Press, p. 98-104, 1991.
- HIRANO, S., SEINO, H., AKIYAMA, Y., NONAKA, I. Chitosan: A biocompatible material for oral and intravenous administrations. *Progress in Biomedical Polymers*. New York: Plenum Press, p. 283-290, 1990.
- KORNET, M. J. Microwaves Synthesis and Anticonvulsant Activity of new 3-benzyl-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ones. *J. Heterocyclic. Chem.*, Albuquerque, v. 34, p. 1391-1393, 1997.
- KROGSGAARD-LARSEN, P., LILJEFORS, T., MADSEN, U. Eds. *A textbook of drug design and development*, Harwood: Academic Publishers, 2. Ed, 1996.
- KUBOTA, N., TATSUMOTO N., SANO T., TOYA K. A simple preparation of half *N*-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 324, p. 268–274, 2000.
- MELTON, R. G., KNOX, R. J., CONNORS, T. A. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Drugs Fut.*, Barcelona, v.21, p.167-181, 1996.
- MORITA, Y., KATSURAYA, K., HATANAKA, K. Synthesis and structural analyses of sulfated carboxymethyl chitin. *Sen-I Gakkaishi*, Tóquio, v.55, n.10, p. 480-484, 1999.
- PERRIN, D. D., ARMAREGO, W. L. F., PERRIN, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*. Oxford: Pergamon Press, 2. ed., 1980.
- PROKAI, L.; PROKAI-TATRAI, K.; BODOR N. Targeting drugs to the brain by redox chemical delivery systems. *Med. Res. Rev.*, v. 20, p.367-416, 2000.
- RENKEMA, G. H., BOOT, R. G., MUIJSERS, A. O., DONKER-KOOPMAN, W. E., AERTS, J. M. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J. Biol. Chem.*, Maryland, v. 270, p. 2198-2202, 1995.
- SCHACHT, E.H., VANSTEENKISTE, S., SEYMOUR, L. Macromolecular carriers for drug targeting. In: WERMUTH, C.G., Ed. *The practice of medicinal chemistry*. London: Academic Press, 1996. p. 717-738.
- SEZAKI, H., Biopharmaceutical aspects of a chemical approach to drug delivery: macromolecule-drug conjugates. *Yakugaku Zasshi*, v.109, n.9, p. 611-621, 1989. Apud: *Comprehensive Medline*, (EBSCO), Peabody, UI 9112019, 1990.
- SHIBATA, Y., METZGER, W. J., MYRVIK, Q. N. Chitin particle-induced cell- mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production. *J. Immunol.*, Baltimore, v.159, p. 2462-2467, 1997.

- SHIGEMASA, Y., USUI, H., MORIMOTO, M., SAIMOTO, H., OKAMOTO, Y., MINAMI, S., SASHIWA, H. Chemical modification of chitin and chitosan: preparation of partially deacetylated chitin derivatives via a ring-opening reaction with cyclic acid anhydrides in lithium chloride/*N,N*-dimethylacetamide. *Carbohydr. Polym.*, Amsterdam, v.39, p.237–243, 1999.
- SMITH, P. G., MOSS, A. R. Epidemiology of tuberculosis. In: BLOOM, B.R., Ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington: ASM Press, p. 47-59, 1994.
- SINGH, G., SHARMA, P.D. Mutual prodrugs—a recent trend in prodrug desing. *Indian J. Pharm. Sci.*, Bombain, v.56, n.3, p.69-79, 1994.
- TESTA, B. Prodrug research: futile or fertile? *Biochem. Pharmacol.*, v.68, p. 2097-2106, 2004.
- TESTA, B.; CALDWELL, J. Prodrugs revisited: the "ad hoc" approach as a complement to ligand design. *Med. Res. Rev.*, v. 16, p. 233-241, 1996.
- TJOELKER, L. W., GOSTING, L., FREY, S., HUNTER, C. L., TRONG, H. L., STEINER, B., BRAMMER, H., GRAY, P. W. Structural and functional definition of the human chitinase chitin-binding domain. *J. Biol. Chem.*, Maryland, v. 275, n.1, p. 514-520, 2000.
- WEINER, L.M., An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutial ingredients. In: BRINE, C.J., Ed. *Advances in chitin and chitosan.*, London: Elsevier, 1992.
- WERMUTH, C.G. *In Drug design: Fact or fantasy?* Jolles, G., Wooldridge, K.R.H., Eds., Academic: London, 1984.; pp 47-72.
- WERMUTH, C.G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: _____, ed. *The practice of medicinal chemistry*, London: Academic Press, 2003. p. 697-716.
- YAMAOKA, Y., ROBERTS, R.D., STELLA, V.J. Low-melting phenytoin prodrugs as alternative oral delivery modes for phenytoin: a model for other high-melting sparingly water soluble drugs. *J. Pharm. Sci.*, Washington, v. 72, p. 400, 1983.
- ZONG, Z., KIMURA, Y., TAKAHASHI, M., YAMANE, H. Characterization of chemical and solid state structures of acylated chitosans. *Polymer* Amsterdam, v. 41, p. 899–906, 2000.