

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Instituto de Ciências Exatas**

**Departamento de Química**

**Sheila Rodrigues Oliveira**

**Síntese e Estudo das Atividades Antifúngica e Antitumoral de  
Derivados Acíclicos e Furânicos  $\alpha$ ,  $\omega$ -bis-Funcionalizados**

**Belo Horizonte**

**2012**

**UFMG-ICEx/DQ. 920<sup>a</sup>**

**T. 406<sup>a</sup>**

**SHEILA RODRIGUES OLIVEIRA**

**Síntese e Estudo das Atividades Antifúngica e  
Antitumoral de Derivados Acíclicos e Furânicos  $\alpha$ ,  
 $\omega$ -bis-Funcionalizados**

Tese apresentada ao Departamento de Química do  
Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de  
Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do  
grau de Doutor em Ciências – Química

**Belo Horizonte**

**2012**

Oliveira, Sheila Rodrigues  
Síntese e estudo das atividades antifúngica e  
antitumoral de derivados acíclicos e furânicos  $\alpha$ ,  $\omega$ -  
0482s bis-funcionalizados. 2012.  
2012 xiii, 129 f. : il.

Orientador: Claudio Luis Donnici.

Co-orientadora: Maria Aparecida de Resende  
Stoianoff.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais.  
Departamento de Química.

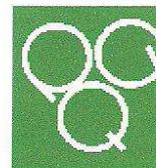
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Derivados acíclicos e  
furânicos - Teses 3. Atividade antifúngica e  
antitumoral - Teses 4. Síntese orgânica - Teses I.  
Donnici, Claudio Luis, Orientador II. Stoianoff, Maria  
Aparecida de Resende, Coorientadora. III. Título.



UFMG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICE<sub>x</sub>  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3499-5732  
FAX: 031 - 3499-5700  
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



**"Síntese e Estudo das Atividades Antifúngica e Antitumoral de Derivados  
Acíclicos e Furânicos alfa, ômega-bis-Funcionalizados"**

**Sheila Rodrigues Oliveira**

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Claudio Luis Donnici - Orientador  
UFMG

Prof. Liliana Marzorati  
USP

Prof. Viviane Martins Rebello dos Santos  
UFOP

Prof. Henriete da Silva Vieira  
UFMG

Prof. Roqueline Rodrigues Silva de Miranda  
UFMG

Belo Horizonte, 11 de setembro de 2012.

**Este trabalho foi realizado sob a orientação  
do Professor Doutor Claudio Luis Donnici e  
Co-orientação da Professora Doutora Maria  
Aparecida de Resende Stoianoff**

*Agradeço especialmente a meus amorosos pais (Nestor e Lourdes), aos meus amados irmãos (Michelle e Talmer) e ao meu marido (Lucas). Amo todos vocês*

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao criador da vida a dádiva a mim concedida.

Aos meus amados pais (Lourdes e Nestor) que são um exemplo de vida e de amor para mim.

Ao meu marido Lucas que, a cada dia, tem se tornado um marido maravilhoso a quem eu amo muito.

Aos meus irmãos (Michelle e Talmer) que são as pessoas que me fazem levantar quando me sinto mal.

Aos novos membros da minha família: Gustavo e Eveline, em especial, ao presente dado pelo meu irmão e pela Eveline, à Brisa: a vida ficou muito mais feliz na minha família graças a ela!

Ao meu pai científico, que me apoia em todos os momentos árduos desta jornada, Donnici: não há palavras que expressem a minha tamanha gratidão, a minha admiração e a grande amizade que sinto pelo senhor.

À pessoa que eu procuro sempre me espelhar, exemplo de ética e profissionalismo: à minha co-orientadora Maria Aparecida de Resende.

Aos amigos que caminharam junto comigo: Helga Gabriela, Marcos Roberto, João Paulo, Ana Cândida, Luciano Nogueira.

Aos amigos do laboratório 252: Marianne Sardenberg, Marina Melo, Thiago Oliveira, Adriana Rodrigues, Gracianne Ramos de Siqueira, Jéssica Braga, Rafael, Alessandra, Lucas, Jean, Mercês, Fernanda, Láuris, Larissa e Rafaela Domingos Pereira (meu braço direito)... todos vocês são muito especiais...desejo muito sucesso a todos!!!

Às inesquecíveis amigas de graduação: Cris, Lucilaine, Otávia, Helga...

Aos meus amigos do GEEMEQ, com quem cresci profissionalmente: Ana Luisa de Quadros, Helga, Frank, Gilson, Fernando, Juliana, Leandro e Dayse.

Aos amigos de pós-graduação, em especial, à Débora, à Ana Rosa, Adriana Bracarense.

À professora Míriam Tereza Paz Lopes e aos colegas do laboratório de Farmacologia pela incalculável ajuda: Kátia e Dalton.

À professora Maria Auxiliadora (ICB) e aos colegas do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (MOA): Simone e Felipe.

Aos professores do departamento que me acompanharam na minha jornada acadêmica.

Ao professor William Rocha, Charles e ao professor Rodinei pela colaboração que significativamente contribuiu para a conclusão deste trabalho.

À professora Maria Helena de Araújo, pela presteza e atenção sempre dedicadas à minha pessoa.

Aos funcionários deste departamento de química, que fazem com que este departamento funcione, em especial, Anderson, Seu Romário, Jacaré, Márcia, Renato, Denise, Sônia...

Às queridíssimas secretárias da pós-graduação deste departamento: Paulete, Lilian e Kátia. Ao coordenador do colegiado de pós-graduação Humberto Stumpf.

Aos órgãos financiadores: CNPQ e FAPEMIG que arcaram financeiramente com a pesquisa aqui desenvolvida.

## Resumo

O presente trabalho apresenta os resultados obtidos na síntese e no estudo da atividade farmacológica de novas entidades químicas bioativas (NCEs, *New Chemical Entity*) podem ser compostos  $\alpha,\omega$ -bis-funcionalizados formados entre: compostos organossulfurados (sulfetos e seus análogos sulfóxidos e sulfonas) substituídos com tetrazóis [Y(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>X-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Y; Y=tetrazol; X=S,SO,SO<sub>2</sub>; n=2,3] e com hidrazidas [Y(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Y], Y=CONHNH<sub>2</sub>, n=1,2]; tetra-hidrofuranos-2,5-bis-funcionalizados com grupo S-tioureido (Y=SCNRNR<sub>2</sub>, bioisósteros de amidinas) [YCH<sub>2</sub>X-CH<sub>2</sub>Y; Y=SCNRNR<sub>2</sub>, R=H,Me; X=2,5-THF-]. Outra classe também foi estudada: os organossulfurados e bioisósteros diamino-substituidos complexados com platina. Neste trabalho quarenta substâncias foram sintetizadas, por rotas clássicas, a saber: dois derivados dinitrila (**1-2**), dez derivados tetrazólicos (**3-12**), quatro bis-ftalimidas (**35-38**), quatro diaminas (**21, 23, 39 e 40**), três di-haletos de alquila (**31, 33 e 34**), um complexo de platina, dez derivados furânicos (**46-51, 53-56**), quatro derivados carboxílicos intermediários (carbóxi, **63 e 64** e carbetóxi, **65 e 66**) e duas hidrazidas (**67 e 68**); dentre estas substâncias 14 são inéditas na literatura (**4-6, 8-12, 41, 51, 53-57**). Todos os precursores, intermediários e produtos finais foram devidamente caracterizados através das técnicas usuais de caracterização espectrométrica (IV, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, ESI-MS) e físico-química (determinação de ponto de fusão e Análise Elementar, quando necessária). A atividade biológica destes compostos  $\alpha,\omega$ -bis-funcionalizados preparados foi investigada contra fungos patogênicos (*Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Aspergillus clavatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. tamarii*; *Cryptococcus neoformans*, *C. gatti*, *Saccharomices cerevisiae*, *Sporotrix schenkii* e *Paracoccocidioides brasiliensis*). Os derivados tetrazólicos investigados e seus precursores dinitrilas mostraram amplo espectro de ação contra as cepas clínicas isoladas de *P. brasiliensis*, bem como contra as espécies de *Candida* estudadas, exceto *C. glabrata*; cabe ressaltar que AMB, um antifúngico padrão na clínica médica, não se mostra ativa contra *P. brasiliensis*; somente um dos derivados sulfóxido-bis-tetrazólico foi ativo contra *C. gatii* e as sulfonas-bis-tetrazólicas foram ativas contra *C. krusei*, *Aspergillus clavatus* e *A. niger*. As hidrazidas sintetizadas, compostos de estrutura simples e de fácil obtenção, foram ativas frente às espécies de *Aspergillus*, de *Cryptococcus* e de *Candida*, destacando-se a atividade contra *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. krusei* que costumam ser as espécies menos susceptíveis aos fármacos usuais. A atividade citotóxica dos compostos foi investigada contra linhagem de células de rim de hamster bebê (BHK) e de células cancerígenas (carcinoma mamário murino 4T1(M), adenocarcinoma de pulmão (A549), melanoma humano (MEWO) e glioma de rato (C6). Uma das nitrilas, bem como um dos bis-tetrazóis-sulfeto e as sulfonas tiveram atividade contra câncer mamário (4T1), destaca-se a atividade de uma delas (<10<sup>-7</sup> mol.L<sup>-1</sup>); ressalta-se que estes três derivados mostraram baixa toxicidade frente a células sadias; as dinitrilas e o derivado sulfeto-bis-tetrazólico foram ativos contra células de melanoma, sendo que este último foi o único que apresentou atividade contra glioma de rato (C6), nenhum dos tetrazóis ou nitrilas foram ativos contra câncer de pulmão (A549).

## Abstract

The present work presents the results obtained from the synthesis and the biological of several bioactive NCEs (NCE= New Chemical Entity), novel  $\alpha,\omega$ -bis-functionalized molecular hybrids which were formed between: organosulfur compounds (sulphides and their corresponding sulphoxides and sulphones) functionalized with tetrazolic rings [ $Y(CH_2)_nX-(CH_2)_nY$ ;  $Y$ =tetrazole;  $X=S,SO,SO_2$ ;  $n=2,3$ ] and with hydrazides [ $Y(CH_2)_nS-(CH_2)_nY$ ,  $Y=CONHNH_2$ ,  $n=1,2$ ]; tetrahydrofurans-2,5-bis-functionalized with S-thioureido ( $Y=SCNRNR_2$ , bioisosters from amidines) [ $YCH_2X-CH_2Y$ ;  $Y=SCNRNR_2$ ,  $R=H,Me$ ;  $X=2,5-THF$ ]. The preparation of the analogous N-alkyl- $\omega$ -S-thioureido-tetrazoles was also investigated. Since, the  $\alpha,\omega$ -bis-dinitriles were obtained as tetrazole precursors, the corresponding reduced amines were also prepared in order to get a third  $\alpha,\omega$ -bis-functionalized hybrid class: the organosulfur (and bioisosteric derivatives) diamino-substituted compounds coordinated with platin, another very promising and with broad pharmacological agent. It is noteworthy that all derivatives were previously planned through rational design with molecular calculations and QSAR techniques. Then, via classical and well-known synthetic routes, 40 compounds were synthesized, among them 14 are novel. These synthesized  $\alpha,\omega$ -bis-functionalized hybrids were tested against pathogenic fungi (*Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*; *Aspergillus clavatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus* and *A. tamarii*; *Cryptococcus neoformans* and *C. gatti*, *Saccharomices cerevisae*, *Sporotrix schenkii* and clinically isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*). The investigated tetrazole hybrids and their corresponding dinitriles showed broad action spectra against all clinically isolates from *P. brasiliensis*, such as against all *Candida* species; it is remarkable that AMB, a standard antifungal agent, is not active against *P. brasiliensis*; only one bis-tetrazole-sulphoxide was active against *C. gatti* and the tetrazole-sulphones were active against *C. krusei*, *Aspergillus clavatus* e *A.niger*. The hydrazides, simple and easily obtaining molecules, showed activity against all species of *Aspergillus*, *Cryptococcus* and *Candida*, the susceptibility of *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. krusei* to these compounds is really remarkable since these pathogenic fungi is usually less susceptible to the common antifungal agents. The cytotoxic activity of the tetrazolic derivatives were evaluated against baby hamster kidney cells (BHK) and against some cancer cells: murine mammarian carcinoma - 4T1(M),lung adenocarcinoma- A549, human melanoma-MEWO and rat glyoma-C6. One nitrile, one bis-tetrazole-sulfide and both sulfone-tetrazoles presented activity against 4T1, and one of them at very low concentration ( $< 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>); it is noteworthy that these compounds showed high selectivity and low toxicity to healthy cells (BHK). The dinitriles and one of the bis-tetrazole-sulphide were activity against MEWO, and the latter compound was the only one active against C6; none of the studied compounds were active against A549.

## Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Alvos dos principais fármacos na célula fúngica. ....  | 5  |
| Figura 2. Mecanismo de ação de 5-Flucitosina.....  | 8  |
| Figura 3. Estrutura química de: (a) Anfotericina B, (b) nistatina e (c) natamicina.....  | 9  |
| Figura 4. Estruturas moleculares de naftinina (a), terbinafina(b), tolnaftato (c), tociolato(d) e amorolfina(e). ....  | 10 |
| Figura 5. Etapas da Biossíntese do Ergosterol e Alvos Moleculares dos Fármacos que atuam nesta biossíntese. ....   | 11 |
| Figura 6. Estrutura química dos principais antifúngicos EBI's, cinco imidazóis: clotrimazol (a), econazol (b), miconazol (c), cetoconazol (d) e benzimidazol (e); cinco triazóis: itraconazol (f), fluconazol (g), voriconazol (h), posaconazol (i) e ravuconazol (j).....   | 13 |
| Figura 7. Estrutura química de três equinocandinas utilizadas clinicamente: micafungina (a), caspofungina (b) e anidulafungina (c); (d) griseofulvina .....  | 16 |
| Figura 8. Estrutura química de duas substâncias usadas como moduladores de resistência a antifúngicos: (a) clorpromazina, (b) fenotiazina e estrutura do antifúngico oxpoconazol (c). ....   | 18 |
| Figura 9. Visão geral do ciclo celular dos mamíferos. ....   | 20 |
| Figura 10. Mecanismo normal de crescimento celular.....  | 22 |
| Figura 11. Agentes alquilantes: (a) busulfan, (b) carmustina (BCNU), (c) clorambucil, (d) ciclofosfamida, (e) mecloretamina e (f) Estramustina. ....   | 24 |
| Figura 12. a) Algumas das ligações cruzadas que podem ocorrer entre um agente alquilante bifuncional e o DNA; b) Exemplos de produtos de alquilação do DNA .....   | 25 |
| Figura 13. Estrutura molecular de amsacrina. ....  | 25 |
| Figura 14. Mecanismos celulares de MDR: OAT: transportadores de ânions orgânicos, CTR1: proteína membrânica integral homotrimerica que transporta cobre reduzido ( $\text{Cu}^+$ ), CNT: transportador de nucleotídeo concentrativo, RFC: carreador de folato reduzido conhecido como transportador metotrexato. Alvos para quimioterapia, DNA, tubulina, topoisomerases I e II (TI e TII). ABC: ATP Binding cassette; MRP1, MRP2: Proteínas associadas a resistência aos fármacos; P-gp: ABCB1..... | 28 |
| Figura 15. Inibidores de MDR de primeira geração: (a) verapamil, (b) ciclosporina A, (c) reserpina, (d) quinina .....  | 30 |
| Figura 16. Moduladores MDR de segunda geração: (a) PSC833, (b) VX-710, (c) S9788 e de terceira geração (d) taquiridar. ....  | 31 |
| Figura 17. Rota retrossintética de bis-tetrazóis obtidos. ....   | 34 |
| Figura 18. Retrossíntese proposta para preparação de compostos bis-s-tioureidos-tetrazólicos. ....   | 35 |
| Figura 19. Retrossíntese planejada para diaminas a partir de dinitrilas.....   | 35 |
| Figura 20. Retrossíntese para preparação de diaminas via síntese de Gabriel.....   | 36 |
| Figura 21. Retrossíntese dos complexos planejados. ....  | 36 |
| Figura 22. Rota retrossintética de compostos furanos e tetra-hidrofuranos. ....  | 37 |
| Figura 23. Rota retrossintética de compostos hidroxilaminas. ....  | 37 |
| Figura 24. Estruturas das substâncias propostas para estudo nesta tese, com excessão de 45 que é um precursor para síntese dos compostos furânicos e tetra-hidrofurânicos. ....  | 38 |
| Figura 25. Medicamentos que apresentam anéis tetrazólicos: (a) losartan, (b) irbesartan, (c) valsartan e (d) TAK-456.....  | 39 |
| Figura 26. Compostos organossulfurados presentes no alho com atividade biológica comprovada: (a) Ajoeno, (b) Dialil sulfeto (DAS), (c) Dialil dissulfeto (DADS), (d) Dialil trissulfeto (DATS). ....   | 40 |
| Figura 27. Rota sintética de bis-tetrazóis obtidos.....  | 40 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 28. Rota sintética de obtenção de dinitrilas 1 e 2.....   | 41  |
| Figura 29. Mecanismo geral de reação para preparação de derivados dinitrilas.....  | 41  |
| Figura 30. Rota sintética para obtenção de bis-tetrazóis 3 e 4.....  | 42  |
| Figura 31. Mecanismo geral de preparação de derivados tetrazóis.....   | 43  |
| Figura 32. Sistema 1,3-dipolo para reações envolvendo formação de anel tetrazólico.....  | 44  |
| Figura 33. Duas maneiras de sobreposição de orbitais em uma cicloadição térmica [4+2].....   | 44  |
| Figura 34. Mecanismo geral de fragmentação do anel tetrazólico, proposto para as<br>fragmentações do adulto $[M+Na]^+$ de 3.....   | 46  |
| Figura 35. Rota sintética de obtenção de sulfóxidos bis-tetrazóis 5 e 6.....   | 47  |
| Figura 36. Mecanismo geral da reação para obtenção de sulfóxidos a partir da oxidação de<br>sulfetos com periodato.....  | 47  |
| Figura 37. Estruturas de ressonância de um sulfóxido.....  | 48  |
| Figura 38. ESI: Íons moleculares $[M+Na]^+$ $m/z$ 269 e $[M-H_2O+Na]^+$ $m/z$ 247 para o composto 5.<br>.....  | 49  |
| Figura 39. Formação do íon $m/z$ 169 originado à partir da fragmentação de $m/z$ 265.....  | 50  |
| Figura 40. Rota sintética de obtenção de sulfonas bis-tetrazóis 7 e 8.....   | 50  |
| Figura 41. Mecanismo geral proposto de oxidação de sulfeto a sulfona na presença de peróxido<br>de hidrogênio e ácido acético glacial.....   | 51  |
| Figura 42. Rota sintética de obtenção de bis-tetrazóis dialquilados preparados: uma<br>exemplificação dos isômeros obtidos para o produto 9.....   | 54  |
| Figura 43. Complexos derivados de $\alpha,\omega$ -diaminas propostos para a tese.....   | 56  |
| Figura 44. Retrossíntese de aminas propostas para a tese.....  | 57  |
| Figura 45. Mecanismo de reação proposto por Osby e colaboradores.....  | 57  |
| Figura 46. Rota sintética geral de aminas preparadas para a tese.....  | 59  |
| Figura 47. Mecanismo proposto para síntese de Gabriel.....   | 59  |
| Figura 48. Rota sintética proposta para obtenção dos complexos.....  | 63  |
| Figura 49. Possíveis estruturas do composto obtido pela reação de complexação entre 22 e<br>$K_2PtCl_4$ .....  | 64  |
| Figura 50. Compostos do tipo S-tioureido estudados anteriormente: (a) 1,5- bis- S-tioureido-3-<br>oxapentano (b) 2,5-bis-(S-tioureidometil)-furano.....  | 66  |
| Figura 51. Rota sintética de obtenção de 46.....   | 66  |
| Figura 52. Esquema de obtenção de 46 e 47.....   | 67  |
| Figura 53. Mecanismo proposto para redução do grupo aldeído.....   | 67  |
| Figura 54. Rota sintética de obtenção de 49 e 50.....  | 68  |
| Figura 55. Rota sintética de obtenção de bis-tioureidos.....   | 68  |
| Figura 56. Rota sintética de tentativa de redução de furanos.....  | 71  |
| Figura 57. Rota sintética de compostos hidrazidas.....   | 72  |
| Figura 58. Figura ilustrativa de teste de disco difusão.....   | 106 |
| Figura 59. Placa de Elisa de 96 orifícios: Distribuição das concentrações de duas substâncias e<br>quatro espécies de fungos testadas por placa.....   | 109 |
| Figura 60. Demonstração da diluição seriada dos compostos testados.....  | 110 |
| Figura 61. Placa de petri subcultivada em duplicata para diferentes concetrações em $\mu\text{g/mL}$ , A,<br>controle de esterilidade (negativo) e B é o controle de crescimento (positivo)..... | 112 |
| Figura 62. Modelo da placa de Petri de 96 orifícios utilizada para determinação CIM das<br>substâncias sintetizadas.....   | 114 |
| Figura 63. Redução do MTT e do XTT a formazana.....  | 117 |
| Figura 64. Estrutura dos compostos inéditos preparados.....  | 119 |

## Índice de Tabelas

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 1. Mecanismos de ação moleculares de agentes antifúngicos.....   | 6   |
| Tabela 2. Dados de espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e de espectro na região do infravermelho dos produtos (1) e (2)..... | 42  |
| Tabela 3. Dados de espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e de espectro na região do infravermelho dos produtos (3) e (4)..... | 46  |
| Tabela 4. Dados de espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e de espectro na região do infravermelho dos produtos 5 e 6.....     | 49  |
| Tabela 5. Dados de espectros de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ e de IV de 7 e 8.....  | 52  |
| Tabela 6. Dados de Espectros obtidos dos produtos 9-12.....   | 55  |
| Tabela 7. Tentativas de preparação de aminas a partir de precursores nitrilas.....  | 58  |
| Tabela 8. Dados de espectros obtidos dos produtos dicloretos, bis-ftalimidias e diaminas.....   | 62  |
| Tabela 9. Tentativas de preparação de complexos compostos por platina.....  | 65  |
| Tabela 10. Dados de métodos espectrométricos e espectroscópicos da série de furanos obtidos. ....                                       | 70  |
| Tabela 11. Dados obtidos de análises espectrométricas e espectroscópicas dos precursores 63 a 68.....                                   | 73  |
| Tabela 12. Lista de reagentes utilizados e marcas dos mesmos. ....  | 76  |
| Tabela 13. CIM dos fármacos utilizados como padrões de comparação.....  | 101 |
| Tabela 14. Concentração inibitória mínima (CIM <sub>80-100</sub> ) dos compostos 1-8. ....  | 102 |
| Tabela 15. Concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos testados.....  | 104 |
| Tabela 16. Atividade antifúngica de hidrazidas e complexos de platina.....  | 105 |
| Tabela 17. Halos de inibição para <i>P. aeruginosa</i> dos compostos 1-8.....   | 107 |
| Tabela 18. Concentrações de atividade <i>in vitro</i> linhagens de células BHK, 4T1, A549, MEWO e C6 para os compostos 1-8. ....        | 107 |

## Siglas, Abreviaturas e Símbolos

$\delta$ : Deslocamento Químico em partes por milhão (PPM)

$\mu\text{g}$ : Micrograma ( $10^{-6}$  g)

$\mu\text{L}$ : Microlitro ( $10^{-6}$  L)

5FdUMP: S-fluorodeoksiuridina monofosfato

5FU: 5-Fluouracil

5FUDP: 5-fluorouridina difosfato

5FUMP: 5'-uridina monofosfato pirofosforilase

5FUTP: 5-fluorouridina trifosfato

Å: Angstrom ( $10^{-10}$  m)

AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

AMB: Anfotericina B

ASD: Agar Sabouraud Dextrose

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATP: Trifosfato de adenosina

ATR: *Attenuated total reflectance* (Reflexão total atenuada)

Bax: Bcl2-associado com a proteína X, é uma proteína da família dos genes bcl-2 que regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria sendo pró-apoptóticos. Portanto aceleram a apoptose celular competindo propriamente com Bcl-2

Bcl-2: "*B-cell lymphoma 2*", "linfoma de células B 2", refere-se a uma família de genes dos mamíferos e às proteínas a que estes genes dão origem. Estes regulam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria sendo anti-apoptóticos. Portanto reprimem a apoptose

BCNU: Carmustina

BDA: Agar Batata Dextrose

C: Concentração Molar

CCD: Cromatografia de Camada Delgada

CDK: *Cyclin-dependent kinases*, família de proteínas pertencentes à família das quinases que regulam o ciclo celular.

CDK: Quinases dependentes de ciclinas

CFM: Concentração Fungicida Mínima

Ciclina A: Proteína necessária para o progresso da fase S do ciclo celular

Ciclina E: proteína necessária para a transição da fase G1 para fase S do ciclo celular

CIM: Concentração inibitória mínima

*cis-Pt*: *cis*-Platina

CNT: transportador de nucleotídeo concentrativo

COS: compostos organossulfurados

CTR1: proteína membrânica integral homotrimerica que transporta cobre reduzido ( $\text{Cu}^+$ )

Cy: ciclosporina

DADS: Dialil dissulfeto

DAS: Dialil sulfeto

DATS: Dialil trissulfeto

DBU: 1,8 – diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

DEPT: *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer* – realce não distorcido por transferência de polarização

DIEs: Doenças Infecciosas Emergentes

DL<sub>50</sub>: Dose Letal para 50% de Inóculo

DMF: Dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*

DOX: Doxorubicina

DTU: 1,3-dimetil-2-tioureia

E: Eliminação

EBIs: Inibidores da biossíntese de ergosterol

EIDs: *Emerging Infections Diseases*

ERG1: Esqualeno Epoxidase

ERG11: Enzima citocromo P450 14 $\alpha$ -demetilase

Erg11p: Lanosterol 14  $\alpha$  -desmetilase

ERG2:  $\Delta^{14}$ - redutase (delta-14-esterol redutase)

ERG24:  $\Delta^{7,8}$ - isomerase (C-8 Esterol isomerase)

ERG3: C-5 esteroide redutase

ESI-MS: Espectrometria de massa por *eletrospray*

Et<sub>3</sub>N: Trietilamina

EtOH: etanol

F.M.: Fórmula molecular

família E<sub>2F</sub>: Família de descrição dos fatores do DNA, sendo genes que promovem a progressão do ciclo celular

fase G<sub>0</sub>: é a fase final do desenvolvimento em que a célula encontra-se no estado quiescente (que é permanente para os neurônios) até o momento em que a mesma é estimulada por fatores de crescimento

fase G<sub>1</sub>: as células aumentam de tamanho, produzem RNA e proteínas.

fase G<sub>2</sub>: a célula continua crescendo e produzindo proteínas e no final desta fase também agem os genes supressores de tumor.

fase S: ocorre a replicação do DNA.

FDA: *Food and Drug Administration*

FLC: Fluconazol

Gene *mdr1*: *multi-drug resistance genes 1*

Gene *mdr2*: *multi-drug resistance genes 2*

Gene *p21*: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*, um inibidor de CDK, sendo um gene que regula a progressão da célula na fase G<sub>1</sub>, prevenindo a proliferação celular. A expressão deste gene é controlada pela proteína p53. A mutação ou perda de expressão de p21 não gera câncer necessariamente, mas causa uma pré-disposição.

Gene *p53*: proteína citoplasmática responsável, entre outras funções, pela verificação de eventual mutação genética durante a replicação da célula. A mutação deste gene é responsável pela maior parte das ocorrências de câncer no mundo.

genes *FKS1* e *FKS2*: unidades catalíticas presentes em β-1,3-glucano-sintetase.

GP-P: Glicoproteína-P

GST: Glutathione S-transferase

HMF: Hidroximetilfurfural

IC: Culturas isoladas clinicamente

IC<sub>50</sub>: concentração inibitória de 50% (µg/mL)

IFIs: Infecções Fúngicas Invasivas

IGF: Interconverção de Grupo Funcional

IV: Espectrometria na Região do Infravermelho

$J^n$ : Constante de Acoplamento

$K_2PtCl_4$  tetracloroplatinato de potássio ( $K_2PtCl_4$ )

LASELORG-QUIM: Laboratório de Síntese e Eletrosíntese Orgânica

LD<sub>50</sub>: Dose Letal - dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população em teste

log P: Coeficiente de Partição

MARSA: *Staphylococcus aureus* multirresistente

MDR : *Multi Drug Resistance* termo utilizado para descrever o fenômeno de resistência que alguns tumores apresentam diante de um determinado grupo de fármacos

MeOH: metanol

MET: *Multidrug efflux transporter*

MM: Massa molecular

mmol: milimol

MO: irradiação de micro-ondas

MOPS: Ácido-2-(N-morfolino)-propanossulfônico

MRP1, MRP2: Proteínas associadas a resistência aos fármacos;

MTT: Brometo de 3-(4', 5'-dimetiltiazol-2'-ila)-2,5-difeniltetrazol

MTU: 1-metil-2-tiourea

N.C.: Não ocorreu crescimento no controle

N.E.: Experimento não efetuado

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NI: Não inibiu nas concentrações testadas

OAT: Transportadores de ânions orgânicos,

OMS: Organização Mundial de Saúde

P.M.: peso molecular

P45014DM: citocromo P450-dependente 14 $\alpha$ -lanosterol demetilase

PF: Ponto de fusão

P-gp: Glicoproteína P ( ABCB1)

Pht: ftalimida

pKa: Logarítimo da constante de acidez

ppm: Partes por Milhão

proteína MRP1: Proteína resistente a múltiplos fármacos

proteína p53: mesmo que gene p53

Proteínas ABC ou Transportadores ABC: superfamília de proteínas transportadoras que utilizam a energia da hidrólise de ATP para transportar substâncias entre a membrana, tanto para dentro como para fora.

PSC833, VX-710 e S9788

QSAR: Relações Quantitativas Estrutura-Atividade (*Quantitative Structure Activity Relation Ship*)

R: Redução

Rb: Gene retinoblastoma

$r_f$ : Fator de Retenção

RFC: carreador de folato reduzido conhecido como transportador metotrexato

RMN  $^{13}\text{C}$ : Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze

RMN  $^1\text{H}$ : Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

RNA: *Ribonucleic Acid*

ROS: Reactive Oxygen Species, moléculas reativas que contém oxigênio

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SBF: Soro Bovino Fetal

SIDA: síndrome de imunodeficiência adquirida

$S_N$ : Substituição nucleofílica

$S_{N2}$ : Substituição nucleofílica bimolecular

spp.: Várias espécies

subespectro de DEPT

t.a: temperatura ambiente

TAK-456: 1-[(1R,2R)-2-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-3-[4-(1H-1-tetrazolyl)phenyl]-2-imidazolidinone

THF: Tetrahidrofurano

TI: Topoisomerasas I

TII: Topoisomerasas II

TMS: Tetrametilsilano

transportadores ABC: mesmo que proteínas ABC

*trans*-Pt: *trans*-Platina

TU: tioureia

Tz: anel tetrazólico

UFC: Unidade formadora de colônia

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

US: irradiação de ultrassom

VDP: Voltametria por Pulso Diferencial

vol/vol: Volume por Volume

VRP: Verapamil

# Índice

|  |    |
|--|----|
| 1-Introdução .....   | 1  |
| 1.1-Quadro mundial de infecções microbianas .....  | 1  |
| 1.2-Quadro mundial de incidência de câncer.....  | 3  |
| 1.3-Antifúngicos: Importância, Mecanismos de Ação e Resistência .....  | 4  |
| 1.3.1-Uso de 5-Flucitosina: Mecanismo de Ação e Limitações .....   | 7  |
| 1.3.2-Uso de Anfotericina B (AMB): Mecanismo de Ação e Limitações .....  | 8  |
| 1.3.3-Inibidores da Síntese de Ergosterol ( <i>Ergosterol Biosynthesis Inhibitors - EBIs</i> ):<br>Mecanismos de Ação e Limitações ..... | 10 |
| 1.3.4-Equinocandinas: Mecanismos de Ação e Limitações.....   | 15 |
| 1.3.5-Griseofulvina: Mecanismos de Ação e Limitações .....   | 17 |
| 1.3.6-Moduladores de Resistência a Antifúngicos.....   | 17 |
| 1.4-Anticancerígenos: Importância e Mecanismos de Ação e Resistência .....   | 19 |
| 1.4.1-Ciclo celular e características bioquímicas da célula cancerígena .....  | 20 |
| 1.4.2-Quimioterapia: Uma alternativa para o tratamento de câncer.....  | 22 |
| 1.4.3-Mecanismo de resistência não-celular.....  | 26 |
| 1.4.4-Mecanismo de resistência celular.....  | 26 |
| 1.4.5-Moduladores de resistência me mediada por GP-P .....   | 29 |
| 2-Justificativas, Relevância e Objetivos .....   | 32 |
| 2.1-LASELORG-QUIM: Histórico do desenvolvimento de substâncias com atividade biológica   | 32 |
| 2.2-Objetivos Gerais e Específicos .....   | 32 |
| 3-Resultados e Discussão .....   | 39 |
| 3.1-Obtenção de Bis-tetrazóis e COS .....  | 39 |
| 3.1.1-Obtenção de 1,5-bis-(5-dinitril)-3-tiapentano (1) e 1,7-bis-(7- dinitril)-4-tiaheptano (2)<br>.....                                | 41 |
| 3.1.2-Obtenção de 1,5-bis(5-tetrazolil)-3-tiapentano e (3) 1,7-bis(7-tetrazolil)-4-tiaheptano<br>(4) .....                               | 42 |
| 3.1.3-Obtenção de 1,5-bis-(5-tetrazolil)-3-oxatiapentano (5) e 1,7-bis-(7-tetrazolil)-4-oxatia-<br>heptano (6).....                      | 47 |
| 3.1.4-Obtenção de 1,5-bis(tetrazolil)-3-bisoxatiapentano (7) e 1,7-bis(tetrazolil)-4-<br>bisoxatiaheptano(8) .....                       | 50 |
| 3.2 - $\omega$ -Halo- $\alpha$ -alquilação de bis-tetrazóis: Tentativas de obtenção e sucessos parciais .....                            | 53 |
| 3.3-Obtenção de $\alpha,\omega$ -diaminas e Complexos de Platina.....  | 56 |
| 3.4-Síntese e Caracterização dos Compostos Bis-tiourei-dos: Precursores de Análogos Tetra-<br>hidrofuranos .....                         | 66 |
| 3.5-Síntese e Caracterização dos Compostos hidrazidas.....   | 71 |

|  |    |
|--|----|
| 4-Parte Experimental .....   | 74 |
| 4.1-Caracterização dos Compostos .....   | 74 |
| 4.2-Purificação de solventes e preparação de reagente .....  | 74 |
| 4.2.1-Dimetilformamida Anidra (DMF) .....  | 74 |
| 4.2.2-Etanol Anidro .....  | 75 |
| 4.2.3-Ftalimida de Potássio .....  | 75 |
| 4.3-Reagentes Utilizados nas Preparações .....   | 75 |
| 4.4-Preparações e Sínteses .....   | 76 |
| 4.4.1-Síntese de bis-tetrazóis .....   | 76 |
| 4.4.1.1-Preparação de 1,5-bis-(nitril)-3-tiapentano (1) .....  | 76 |
| 4.4.1.2-Preparação de 1,7-Bis-(nitril)-4-tia-heptano (2) .....   | 77 |
| 4.4.1.3-Preparação de 1,5-bis-(tetrazolil)-3-tiapentano (3) .....                                      | 77 |
| 4.4.1.4-Preparação de 1,7-bis(7-tetrazolil)-4-tia-heptano (4) .....                                    | 78 |
| 4.4.1.5-Preparação de 1,5-bis(5-tetrazolil)-3-oxatiapentano (5) .....                                  | 78 |
| 4.4.1.6-Preparação de 1,7-bis(tetrazolil)-4-oxatia-heptano (6) .....                                   | 79 |
| 4.4.1.7-Preparação de 1,7-bis(5-tetrazolil)-3-bisoxatia-heptano (7) .....                              | 80 |
| 4.4.1.8-Preparação de 1,7-bis(tetrazolil)-4-bisoxatia-heptano (8) .....                                | 80 |
| 4.4.2-Síntese de bis-tetrazóis alquilados: .....   | 81 |
| 4.4.2.1-Preparação de 1,5-bis-[1-(2-hidroxi-etil)-1 <i>H</i> -tetrazol-5-il]-3-tia-pentano (9).....    | 81 |
| 4.4.2.4 - Preparação de 1,7-bis-[1-(3-hidroxipropil)-1 <i>H</i> -tetrazol-5-il]- 5-tia-heptano (12) .. | 83 |
| 4.4.3 - Síntese de complexos de Platina .....  | 84 |
| 4.4.3.1 - Preparação de Éter bis-(2-cloroetil) etílico (31).....                                       | 84 |
| 4.4.3.2 - Preparação de 1,7-dicloro-3-tia-heptano (33).....  | 84 |
| 4.4.3.3 - Preparação de de 1,7-dicloro-3-bis-oxatia-heptano (34) .....                                 | 85 |
| 4.4.3.4-Preparação de sulfeto de 3,3'-Tio-bis-(1-ftalimidopropano) (35) .....                          | 85 |
| 4.4.3.5-Preparação de 3,3'-dioxatia-bis-(1-ftalimidopropano) (36) .....                                | 86 |
| 4.4.3.6-Preparação de 3,3'-oxa-bis(1-ftalimidoetano) (37) .....  | 87 |
| 4.4.3.7-Preparação de Hidroclorato de 1,5-diftaloil-3-dietilenotriamina (38) .....                     | 87 |
| 4.4.3.8-Preparação de 1,7-diamino-4-tia-heptano (22) .....   | 88 |
| 4.4.3.9-Preparação de di-hidroclorato de 1,7-diamino-4-tia-heptano (22) .....                          | 89 |
| 4.4.3.10-Preparação de di-hidroclorato de 1,7-diamino-4-bisoxatia-heptano (24) .....                   | 89 |
| 4.4.3.11-Preparação de di-hidroclorato de 1,5-diamino-3-oxa-pentano (39).....                          | 90 |
| 4.4.3.12-Preparação de Tris-hidroclorato de 1,5-diamino-3-aza-pentano (40) .....                       | 90 |
| 4.4.3.13-Preparação de 1,9-diamino-propil-5-sulfanil-cloro-platina (41) .....                          | 91 |
| 4.4.4-Sínteses de derivados furânico Bis-tioureido-substituídos .....                                  | 92 |
| 4.4.4.1-Preparação de L-Hidroximetil-5-furano-2-carboxialdeído (45).....                               | 92 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.4.4.2-Preparação de 2,5-bis-hidroximetil-furano (47) e 1,3-bis-[2-(5-hidroximetil)-furanil]-2-oxa-propano (48).....         | 92  |
| 4.4.4.3-Preparação de 2,5-bis-[S-tioureidometil]-furano(51).....  | 93  |
| 4.4.4.4-Preparação de 2,5-bis-[N,N-dimetil-S-tioureidometil]-furano (53).....   | 94  |
| 4.4.4.5-Preparação de 1,3-bis-[2-(S-tioureidometil)-5-furanil]-2-oxa-propano (54) .....                                       | 95  |
| 4.4.4.6-Preparação de 1,3-bis-[2-((N-metil)-S-tioureido-metil)-5-furanil]-2-oxa-propano (55) .....                            | 96  |
| 4.4.4.7-Preparação de 1,3-bis-[2-((N,N-dimetil)-S-tioureido-metil)-5-furanil]-2-oxa-propano (56) .....                        | 96  |
| 4.4.5-Sínteses de Hidrazidas .....  | 97  |
| 4.4.5.1-Preparação de ácido tioglicólico ou tio-bis-acético (63) .....  | 97  |
| 4.4.5.2-Preparação de Ácido tio-dipropiônico (64) .....   | 97  |
| 4.4.5.3-Preparação de dietiléster do ácido tioglicólico (65) .....  | 98  |
| 4.4.5.4-Preparação de dietiléster do ácido tio-bispropionico (66).....  | 99  |
| 4.4.5.5-Preparação de bis-hidrazida do ácido tioglicólico (67) .....  | 99  |
| 4.4.5.6-Preparação de bis-hidrazida do ácido bis-propionico (68) .....  | 100 |
| 5-Resultados e Discussão da Atividade Biológica Investigada .....   | 101 |
| 5.1-Estudos de Atividade Antifúngica .....  | 101 |
| 5.1.1-Resultados da Avaliação da Atividade Antifúngica (fungistática) de Derivados Tetrazólicos e Precursores .....           | 103 |
| 5.1.2-Estudos de Atividade Fungicida de derivados tetrazólicos e precursores dinitrilas.....                                  | 103 |
| 5.1.3-Resultados da avaliação da atividade antifúngica (fungistática) de derivados tipo hidrazida e complexo de platina ..... | 104 |
| 5.2-Estudos de Atividade Antibacteriana de derivados tetrazólicos.....  | 106 |
| 5.3-Estudos de Atividade Anticancerígena de derivados tetrazólicos .....  | 107 |
| 6-Parte Experimental – Ensaio Biológicos.....   | 108 |
| 6.1-Estudos de Atividade Antifúngica .....  | 108 |
| 6.1.1-Considerações Gerais .....  | 108 |
| 6.1.2-Procedimentos para Determinação da Concentração Inibitória Mínima .....   | 108 |
| 6.1.3-Meio de Cultura .....   | 110 |
| 6.1.4-Origem dos Microrganismos .....   | 111 |
| 6.1.5-Preparação do Inóculo.....  | 111 |
| 6.1.6-Estudo da Atividade Fungicida .....   | 112 |
| 6.2-Estudos de Atividade Antibacteriana .....   | 112 |
| 6.2.1-Considerações Gerais .....  | 112 |
| 6.2.2-Aparelhos Utilizados.....   | 113 |
| 6.2.3-Origem das Linhagens e Meio de Cultura .....  | 113 |

|   |     |
|---|-----|
| 6.2.4-Materiais .....   | 113 |
| 6.2.5-Procedimentos para teste de susceptibilidade em disco-difusão .....     | 113 |
| 6.2.6-Procedimentos para determinação da concentração inibitória mínima ..... | 114 |
| 6.3-Estudos de Atividade Anticancerígena .....                                | 115 |
| 6.3.1-Considerações Gerais .....  | 115 |
| 6.3.2-Aparelhos Utilizados.....   | 115 |
| 6.3.3-Origem das Linhagens e Meio de Cultura Celular .....                    | 115 |
| 6.3.4-Ensaio Colorimétrico .....  | 116 |
| 6.3.5-Procedimentos Gerais.....   | 117 |
| 7 – Conclusões e Perspectivas .....   | 119 |
| 8 - Referências Bibliográficas .....  | 123 |
| Anexo I.....  | I   |
| Anexo II.....   | V   |
| Anexo III.....  | C   |
| Anexo IV.....   | CIV |

## 1 – Introdução

No quadro mundial de saúde pública, que tem levado à mortalidade e morbidade, destacam-se o câncer (neoplasia) e as doenças infecciosas; esta situação tem sido ainda pior devido ao problema usual da grande toxidez dos fármacos clinicamente utilizados e para ambas as doenças mencionadas há um fator agravante que é o aumento vertiginoso da resistência destes patógenos aos fármacos usuais, o que tem motivado cada vez mais os cientistas a desenvolverem novos fármacos antineoplásicos e antimicrobianos.

Com o objetivo da contextualização deste tema importante, apresenta-se nesta introdução um texto geral abordando este assunto de forma detalhada a seguir. Primeiramente abordar-se-á a avaliação geral da situação das infecções microbianas e das neoplasias, seguindo-se com abordagem mais específica dos mecanismos de ação que conduzem à resistência das patologias citadas.

### 1.1 - Quadro mundial de infecções microbianas:

Nos últimos anos a sociedade tem presenciado o aumento vertiginoso na incidência de doenças há muito tempo combatidas. Entre outras enfermidades, as doenças infecciosas emergentes (DIEs) e as infecções fúngicas invasivas (IFIs) fazem parte de um conjunto de doenças que tem se tornado um grave problema no cenário mundial.

A emergência de infecções, cada vez mais graves e resistentes aos medicamentos disponíveis no mercado, está associada a inúmeros fatores sociais e comportamentais. Entre estes, é possível citar a chamada terapia empírica (administração de medicamentos que não resultarão em resposta, ou seja, auto-medicação), descumprimento das determinações médicas por parte do paciente (doses em excesso ou escassas, término prematuro da terapia, partilha de medicamentos etc.), aumento da proporção de população idosa e imunossuprimida, alimentos inadequadamente cozidos e/ou preservados, uso em larga escala de antibióticos em animais na pecuária, grande número de indivíduos doentes em hospitais e centros de terapias, bolsões de pobreza urbana, marginalização social, falta de iniciativas governamentais, ignorância, um ritmo lento de poucas descobertas de compostos anti-infecciosos, excesso de prescrição de antibióticos, entre outros (Domagala e Sanchez, 1997; Mitscher *et al.*, 1999; Morens *et al.*, 2004; Pfaller e Diekema, 2004).

Assim, surgem as doenças infecciosas emergentes (DIEs, em inglês EIDs - *Emerging Infections Diseases*) que apresentam um grande fardo para as economias globais e saúde pública gerando gastos com pacientes que prefiguram na ordem de dezenas de bilhões de dólares por ano (Mitscher *et al.*, 1999; Morens *et al.*, 2004). Nos EUA, estima-se que o custo anual para o tratamento de pacientes com infecções resistentes aos fármacos comuns seja de 33 bilhões de dólares (Pfaller e Diekema, 2004).

A gravidade e a emergência de DIEs é atribuída inclusive a fatores sócio-econômicos, ambientais e ecológicos, pois uma grande parte das pessoas acometidas por tais enfermidades estão na faixa etária economicamente ativa. No entanto, o fato que mais tem chamado atenção na comunidade médico-científica é que nos últimos anos tem aumentado a incidência de casos de DIES em indivíduos sadios (Mehanna *et al.*, 2004).

Infecções bacterianas e fúngicas se tornaram grandes responsáveis pela mortalidade e morbidade de pacientes imunocomprometidos, principalmente por tuberculose, câncer, SIDA (síndrome de imunodeficiência adquirida) e pacientes recém-transplantados (Jones *et al.*, 2008). Esse grande problema é agravado pelo aparecimento de organismos multiresistentes aos fármacos disponíveis no mercado (MDR - *Multi-drug Resistant*) além do amplo e indiscriminado uso de agentes antimicrobianos clássicos (Travis, 1994). Desta maneira, muitas espécies de bactérias que pareciam estar sob controle têm causado infecções cada vez mais difíceis de serem tratadas e apesar de serem consideradas comuns, tais como *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium* e *Pneumococci* têm se mostrado resistentes à maioria dos medicamentos, por exemplo, existem colônias de *Enterobacter faecium* e *Pseudomonas cepium* que não são sensíveis a nenhum dos fármacos disponíveis no mercado (Mitscher *et al.*, 1999).

A intensificação do aparecimento de infecções fúngicas invasivas (IFIs) se deve principalmente às seguintes espécies de fungos patógenos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (Groll *et al.*, 1996; Shao *et al.*, 2007; Fischbach e Walsh, 2009; Pfaller e Diekema, 2010). As infecções fúngicas afetam bilhões de pessoas no mundo, embora a sua contribuição ao quadro epidemiológico mundial não seja reconhecido, a incidência das IFIs está crescendo demasiadamente em todos os países do mundo, ainda que haja fármacos antifúngicos eficazes (Brown *et al.*, 2012). Apesar do número limitado de classe de medicamentos disponíveis para o tratamento contra tais fungos patógenos, o uso indiscriminado de antifúngicos tem resultado na emergência de novas cepas de fungos resistentes, principalmente das espécies *Candida*, além do mais há poucos estudos com o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (Brown *et al.*, 2012; Tobudic *et al.*, 2012).

Assim, devido ao uso indiscriminado de agentes antifúngicos, a epidemiologia de IFIs tem evoluído para outros fungos oportunistas, tais como fungos leveduriformes (por exemplo, *Trichosporon* e *Rhodotorula spp.*) zigomicetos e bolores hialinos (por exemplo, *Fusarium* e *Scedosporium spp.*) (Shao *et al.*, 2007). Esses novos fungos emergentes são caracterizados pela grande resistência aos fármacos disponíveis, causando grande interesse no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos e antibacterianos (Shao *et al.*, 2007; Ruping *et al.*, 2008).

## **1.2 - Quadro mundial de incidência de câncer**

O câncer está ligado a um conjunto de quase 200 doenças que têm como características comuns: autossuficiência nos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibitórios de multiplicação, evasão de apoptose, angiogênese, ilimitado potencial de replicação, invasão dos tecidos e metástase (Gabriel, 2007; Ruddon, 2007). Câncer ou neoplasia faz parte de uma designação a um conjunto de doenças genéticas resultantes de mutações acumuladas no genoma, essas são associadas ao descontrole de programas essenciais como proliferação, morte e diferenciação celular (de Almeida *et al.*, 2005; Ruddon, 2007). Especialistas afirmam que células transformadas apresentam genoma instável, assim ocorre aquisição acumulativa de mutações que podem converter uma célula normal em célula cancerosa (Hanahan e Weinberg, 2000). Uma célula cancerígena adquire características que podem interferir no tecido afetado e é de conhecimento que células de mamíferos se reproduzem espontaneamente, mas com um determinado tempo medido em horas; as células cancerígenas, por outro lado, podem se dividir continuamente, descontrolada e rapidamente (Groll *et al.*, 1996). Aliadas a essas características de células cancerígenas, a resistência a determinados fármacos pode estar associada ao fato de que células estão sujeitas a processos oxidativos a todo momento e tal fato pode resultar em mutação. Por exemplo, células de rato passam por cerca de 100.000 processos oxidativos por dia, em humanos, esta taxa se reduz a cerca de 10.000 processos (Ames *et al.*, 1993). A maior parte dos danos causados por estas mutações é corrigida, mas o processo de recuperação não é perfeito e mutações ocorrem e se acumulam com a exposição e o tempo (Ruddon, 2007).

Segundo levantamento feito pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo, matando 6,0 milhões de pessoas anualmente. Atualmente, cerca de sete milhões de pessoas morrem de câncer e cerca de 12 milhões de novos casos são diagnosticados a cada ano (Xia e Lee, 2010). Estima-se que no Brasil, em 2012, serão diagnosticados mais de 500 mil novos casos (Silva, 2012). Um fator agravante é que os agentes quimioterápicos antineoplásicos costumam atuar de forma não seletiva lesando não

somente as células malignas como as normais, particularmente, as células gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico (que são de rápido crescimento) o que explica os efeitos colaterais comuns da quimioterapia tais como: náuseas, perda de cabelo e maior suscetibilidade a infecções que, no geral, também apresentam resistência aos fármacos antimicrobianos usuais (Spence e Jonhston, 2001). Já se relataram mecanismos de resistência a agentes antifúngicos e a agentes antitumorais com mecanismo de ação similar (Neckers, 2002; Cowen *et al.*, 2006). Desta forma, este grande problema mundial de saúde tem levado pesquisadores do mundo todo a estudar agentes quimioterápicos, ditos vulgarmente antitumorais ou anticancerígenos (dependendo do estágio e classe), para o tratamento (Foye e Sengupta, 1996).

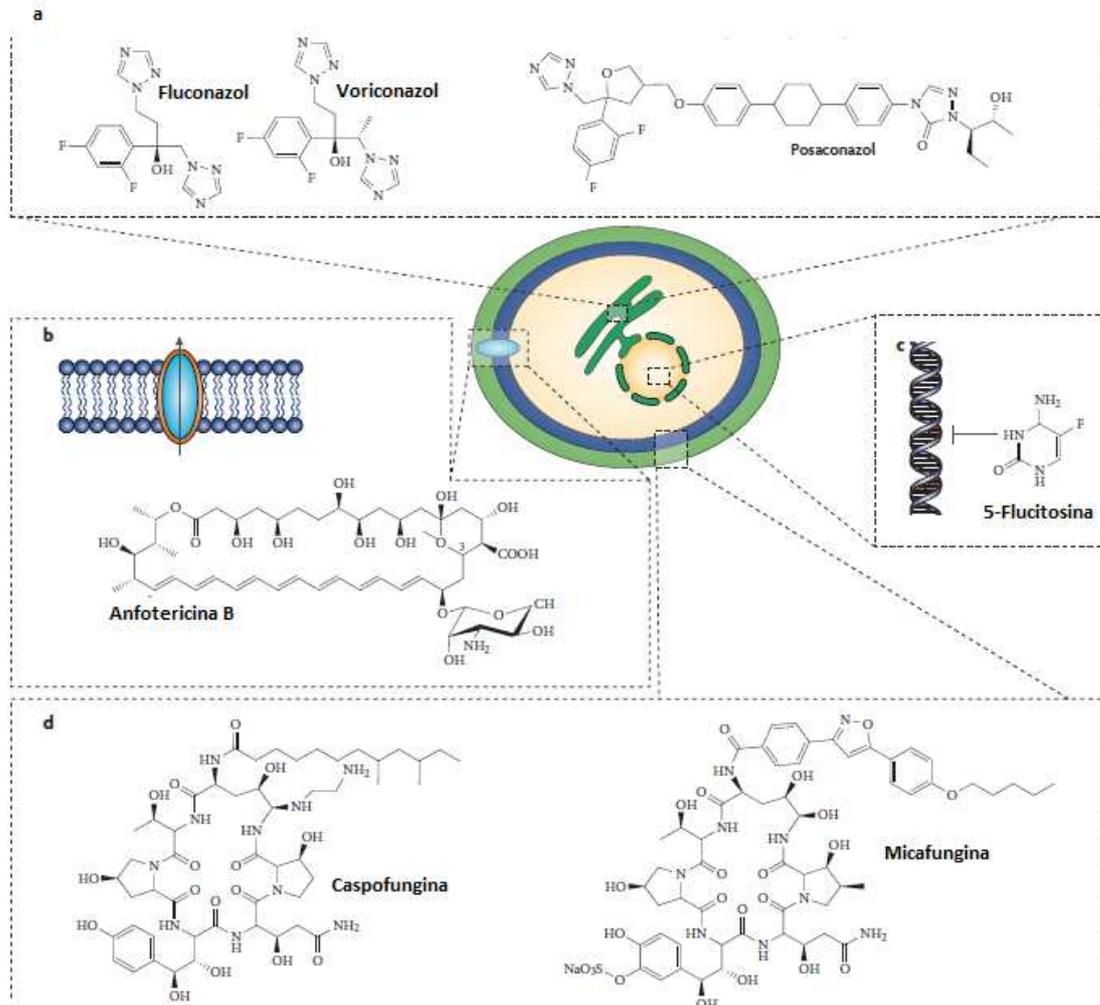
Atualmente, apesar de inúmeros agentes quimioterápicos usados para o tratamento do câncer, estipula-se que devem existir cerca de 350 novos agentes quimioterápicos estudados e aplicados experimentalmente em mais de 20 mil pacientes em todo o mundo, o que comprova esta real necessidade da descoberta de novas entidades químicas bioativas (WHO, 2011).

Assim, denota-se a importância de pesquisa e desenvolvimento de fármacos mais potentes, não apenas para o controle das infecções advindas de DIES e de IFIs, como também para prevenção e tratamento de complicações clínicas decorrentes de tratamentos quimioterápicos como, por exemplo, câncer.

### **1.3 – Antifúngicos: Importância, Mecanismos de Ação e Resistência**

Estudos mostram que a incidência de infecções fúngicas sanguíneas aumentaram de 2% na década de 80 para, até 17% no final dos anos 90 (Fridkin e Jarvis, 1996; MacDonald *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1999; Canuto e Gutierrez, 2002). No Brasil, casuísticas confirmam que as três espécies mais prevalentes isoladas de urina em pacientes hospitalizados são: *Candida albicans* (35,5 a 70%), *C. tropicalis* (4,6 a 52,5%) e *C. glabrata* (7 a 8,8 %) (De Oliveira *et al.*, 2001; Passos *et al.*, 2005; Menezes *et al.*, 2009). Um outro aspecto a ser considerado é o aumento da resistência a antifúngicos que alerta para a necessidade do desenvolvimento de estratégias que evitem a sua disseminação entre os fungos, como já ocorreu com as bactérias, o que se encontra disseminado e fora de controle (Canuto e Gutierrez, 2002; Menezes *et al.*, 2009). Cabe ressaltar que outros pontos vêm sendo observados quanto às principais falhas na quimioterapia antifúngica: doses inadequadas, deficiência de absorção ou metabolismo ou distribuição do fármaco no organismo, interações medicamentosas, neutropenia grave,

presença de corpo estranho (outros tipos de infecções ou câncer) e emergência do fenômeno de resistência aos antifúngicos disponíveis (Canuto e Gutierrez, 2002; Boff *et al.*, 2008).



**Figura 1. Alvos dos principais fármacos na célula fúngica** (Figura adaptada de Cowen, L. E., 2008, Nature Reviews Microbiology, 2008, 6, 187-198).

Com o objetivo da melhor compreensão deste sério problema de saúde pública, é necessário o entendimento dos mecanismos de ação dos fármacos antifúngicos utilizados. Os alvos dos fármacos utilizados contra IFIs (**Figura 1 e Tabela 1**) se limitam na ação contra a célula do fungo (Cowen, 2008). No entanto, como ocorre em muitos outros casos de doenças, por pré-disposição individual do próprio paciente ou pelo fato de que as células dos fungos podem se tornar resistentes às substâncias bioativas utilizadas (**Figura 1**). A resistência a um antifúngico pode ser definida como um ajuste estável e hereditário pela célula do fungo a um determinado agente antifúngico. Uma forma de se mensurar quantitativamente o nível de

resistência de um microrganismo é utilizando o valor da concentração inibitória a 50 % da população fúngica (IC<sub>50</sub> (µg/mL)) pós-tratamento que é comparado ao IC<sub>50</sub> antes do tratamento (Vanden Bossche, 1997).

Assim, denota-se a necessidade de compreender os mecanismos de ação dos medicamentos disponíveis para o tratamento destas IFIs. Na **Tabela 1** se encontram medicamentos e os mecanismos moleculares correspondentes de ação de cada um. No entanto, o uso de cada fármaco é limitado pela peculiaridade de cada substância bioativa, o que corrobora, uma vez mais a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

**Tabela 1. Mecanismos de ação moleculares de agentes antifúngicos** (Vanden Bossche, 1997; Cowen, 2008; Vandeputte *et al.*, 2012)

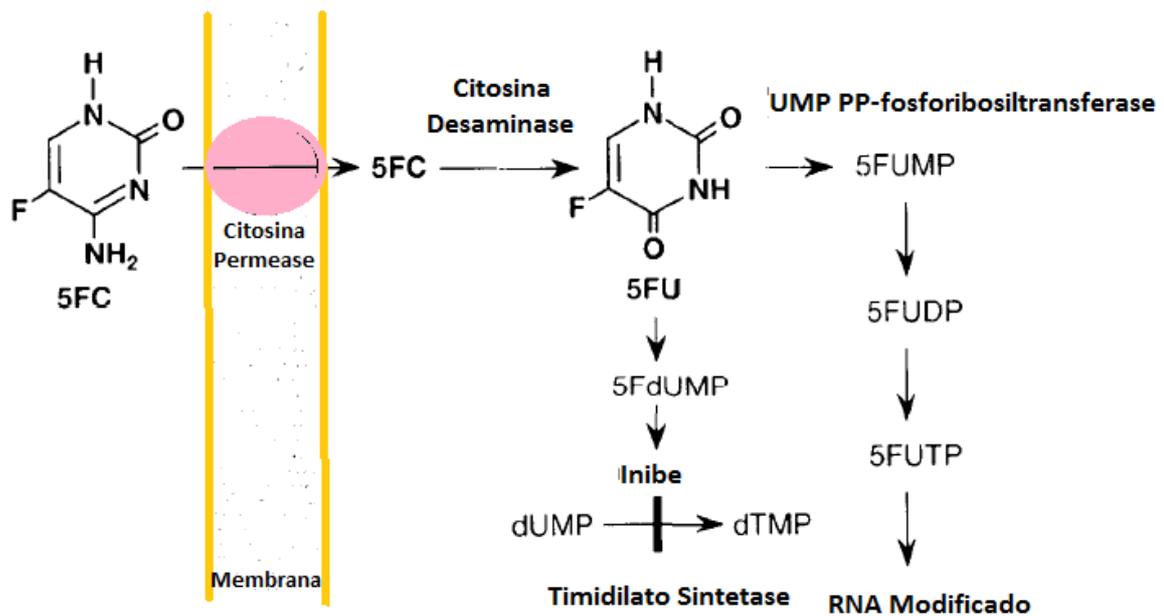
| Alvo   | Classe Química              | Mecanismo de resistência  | Agente   |
|--|-----------------------------|---|--|
| <b>1. Síntese de DNA e RNA</b>                           | Pirimidina                  | <p>Defeito na enzima citosina permease.</p> <p>Deficiência ou falta de enzimas que metabolizam 5FC.</p> <p>Desregulação da etapa de biossíntese de pirimidina.</p>    | Flucitosina (5FC)  |
| <b>2. Interação com o ergosterol</b>                     | Polienos                    | Ausência de ergosterol (mutação)  | Anfotericina B e Nistatina   |
| <b>3. Biossíntese do Ergosterol</b>                      |                             |   |  |
| Esqualeno epoxidase                                      | Alilaminas                  | Desconhecido  | Naftifina e terbinafina  |
|  | Tiocarbamato                | Desconhecido  | Tolnaftato   |
| 14α-Demetilase (citocromo P450 -14DM)                    | Azóis (Imidazóis, Triazóis) | <p>Efluxo mediado por transportadores de fármacos</p> <p>Perda de afinidade em Erg11p por mutação de ERG11</p> <p>Alterações na etapa biossintética do ergosterol</p> | <p>Bifonazol, clotrimazol, econazol, cetoconazol, miconazol</p> <p>Fluconazol, itraconazol, Terconazol</p> |
| Δ <sup>14</sup> -Reductase e Δ <sup>8..7</sup> Isomerase | Morfolinas                  | Morfolinas  | Amorolfina   |
| <b>4. Mitose (microtúbulos)</b>                          | -                           | Não Relatado  | Griseofulvina  |
| <b>5. Bloqueio da Síntese da parede celular</b>          | Equinocandinas              | Resistência intrínseca em <i>Cryptococcus neformans</i> devido à composição da parede celular deste fungo.  | Micafungina, caspofungina, Anidulafungina  |
| β-(1,3)-D-glucano sintetase                              |                             |   |  |

### **1.3.1- Uso de 5-Flucitosina: Mecanismo de Ação e Limitações**

Flucitosina, ou 5FC, foi sintetizada (em 1957) por Duschinsky e colaboradores, inicialmente, como um agente antitumoral (Duschinsky *et al.*, 1960). Em 1963, Grunberg descobriu o potencial antifúngico desta substância que é utilizada com sucesso no tratamento de meningite criptocócica (causada por *C. neoformans*) (Grunberg *et al.*, 1963). Tal fármaco tem um amplo espectro de atuação, e vem sendo utilizado com sucesso no tratamento contra *Candida sp.* e *Cryptococcus sp.* (Tassel e Madoff, 1968). Além de apresentar atividade contra os gêneros *Phialophora*, *Cladosporium* e *Aspergillus*, 5FC também apresenta atividade contra protozoários do gênero *Leishmania* e *Acanthamoeba* (Vandeputte *et al.*, 2012).

A resistência das espécies do gênero *Candida* a 5FC varia em cada país do mundo, alguns especialistas afirmam que fungos que apresentam CIM  $\geq 25$  µg/mL apresentam resistência a tal fármaco. Entre as espécies que apresentam resistência a 5FC estão *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, para ambas as espécies cerca de 21 % das cepas isoladas apresentam resistência, 8 % dos isolados de *C. glabrata* e 2 % de *C. neoformans* apresentam resistência a 5FC (Polak, 1990; Vanden Bossche *et al.*, 1994; Vanden Bossche, 1997).

Quanto ao mecanismo, 5FC penetra na célula do fungo pela ação da enzima citosina permease e imediatamente é convertida a 5-Fluouracil (5FU) pela citosina deaminase (**Figura 2**), a ausência ou baixa atividade desta enzima no organismo dos mamíferos garante a baixa toxicidade de 5FC no organismo humano. Conseqüentemente, 5FU é convertida a 5'-uridina monofosfato pirofosforilase (5FUMP) em ácido 5-fluorouridílico que é fosforilado (5-fluorouridina difosfato - 5FUDP e 5-fluorouridina trifosfato - 5FUTP) e, em seguida incorporado pelo RNA, resultando em um RNA danificado que inibe o crescimento do fungo. Simultaneamente, 5FU é convertida a S-fluorodeoxiuridina monofosfato (5FdUMP), um potente inibidor de timidilato sintetase e desta forma evita a síntese de DNA, o que justifica o efeito fungicida (Polak, 1990; Vanden Bossche *et al.*, 1994; Vanden Bossche, 1997).



**Figura 2. Mecanismo de ação de 5-Flucitosina** (Figura adaptada de Vanden Bossche, 1994, Journal of Medical and Veterinary Mycology, 32, 189-202).

A resistência a 5FC está ligada à perda ou mutação de enzimas que atuam no influxo (ou entrada) do fármaco no meio celular do fungo (citosina permease), no metabolismo do fármaco pelo fungo ou na incorporação do fármaco (ou de derivados) no RNA do fungo (**Figura 2**) (Vanden Bossche, 1997).

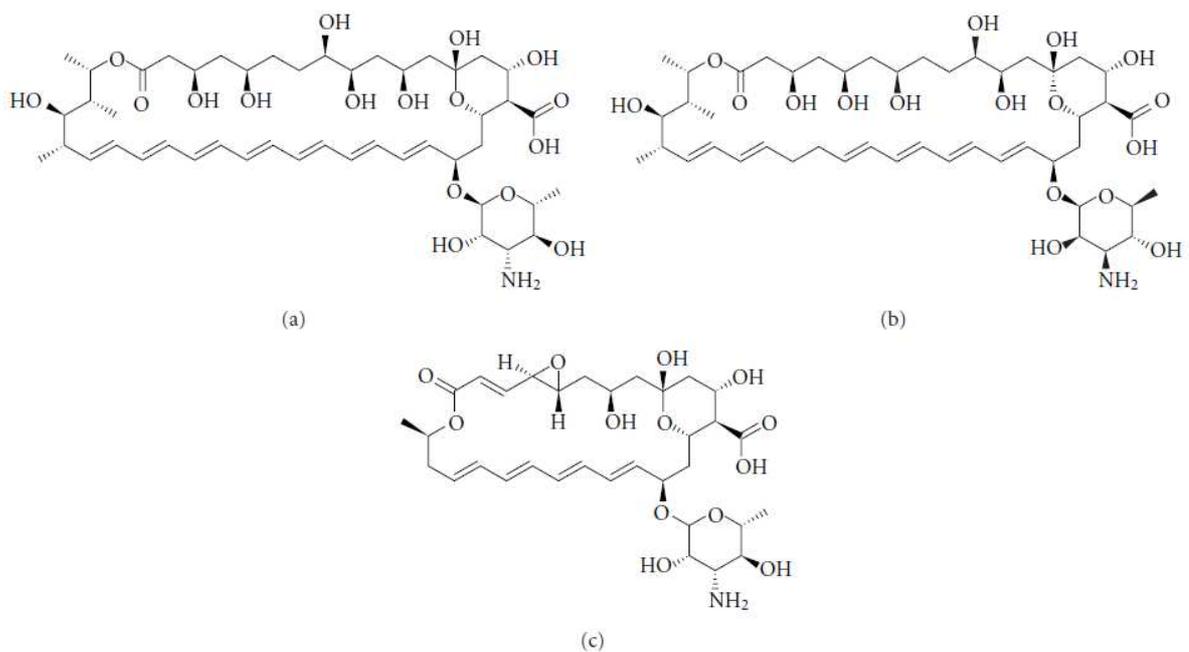
### 1.3.2- Uso de Anfotericina B (AMB): Mecanismo de Ação e Limitações

Mais de 200 moléculas pertencentes à classe dos polienos apresentam atividade antifúngica estudada, muitas destas, são produzidas pela bactéria do gênero *Streptomyces* (Vandeputte *et al.*, 2012). No entanto, apenas três se destacam no uso clínico: anfotericina B, nistatina e natamicina (**Figura 3**) (Vandeputte *et al.*, 2012). Por causa da alta toxicidade, principalmente devida à não negligenciável afinidade com o colesterol, apenas a AMB é utilizada sistematicamente, já nistatina e natamicina são utilizadas localmente (Vandeputte *et al.*, 2012).

A AMB apresenta um amplo espectro de ação contra a maior parte dos fungos patógenos (*Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Scedosporium*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* etc.) e, devido à sua baixa absorção pelo trato gastrointestinal, ela é administrada

intravenosamente. Disponível como fármaco para uso sistêmico, desde 1956, apesar da sua conhecida toxicidade, AMB é, largamente, utilizada na terapêutica das micoses (Boff *et al.*, 2008).

A seletividade de AMB diante de fungos se deve à interação com o ergosterol, presente na membrana dos fungos (Vanden Bossche *et al.*, 1994). A interação deste fármaco com a membrana impede a função de barreira da membrana do fungo, levando à perda de potássio intracelular e concomitante entrada de prótons na célula. A resistência à AMB tem sido observada, particularmente, em espécies de *Candida*, entre elas: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. lusitanae*. Algumas cepas isoladas de *Candida sp.* apresentaram menor teor de ergosterol na membrana do que as espécies susceptíveis a AMB, tal alteração celular minimiza a potência de tal fármaco (Vanden Bossche, 1997; Cowen, 2008). Além disso, algumas colônias com tais alterações na membrana têm sido encontradas em pacientes não-imunocomprometidos desde 1980 (Dick *et al.*, 1980; Vanden Bossche *et al.*, 1994; Vanden Bossche, 1997).

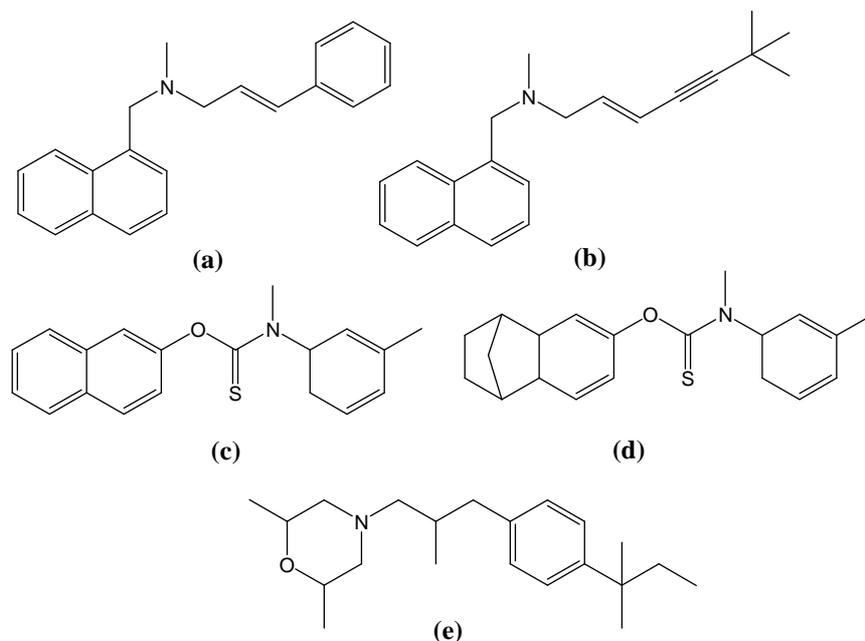


**Figura 3. Estrutura química de: (a) Anfotericina B, (b) nistatina e (c) natamicina.**

### 1.3.3- Inibidores da Síntese de Ergosterol (*Ergosterol Biosynthesis Inhibitors - EBIs*): Mecanismos de Ação e Limitações

Os inibidores da biossíntese de ergosterol (**EBIs**) são os mais importantes agentes antifúngicos utilizados, pela menor toxicidade, uso de administração oral, pela maior estabilidade química molecular entre outros fatores. Todos os **EBIs** (Alilaminas, tiocarbamatos, azóis e morfolinas - **Figura 4 e 6**) inibem enzimas na sequência pós-esqualeno na biossíntese do ergosterol (**Figura 5**).

Alilaminas (naftinina, terbinafina etc.) e tiocarbamatos (tolnaftato, tociolato etc.) (**Figura 4**) têm como alvo a enzima esqualeno epoxidase e, para estes antifúngicos, não tem sido reportada na literatura até o momento casos de resistência (Vanden Bossche, 1997; Vandeputte *et al.*, 2012). Contudo, algumas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Ustilago maydis* (patógeno de milho) apresentaram decréscimo na interação de terbinafina com a enzima alvo ERG1 (Esqualeno epoxidase) além do comprometimento da absorção do fármaco (Vanden Bossche, 1997). Além disso, uma cepa de *C. glabrata*, resistente a fluconazol também apresentou resistência cruzada à terbinafina (Vanden Bossche, 1997). Estes agentes antifúngicos apresentam um amplo espectro de ação e, por apresentarem uma série de efeitos colaterais, são usados para tratamento contra infecções por dermatófitos causadores de infecções nos membros inferiores como *Tinea capitis*, *Tinea pedis* (Vandeputte *et al.*, 2012).



**Figura 4. Estruturas moleculares de naftinina (a), terbinafina(b), tolnaftato (c), tociolato(d) e amorolfina(e).**

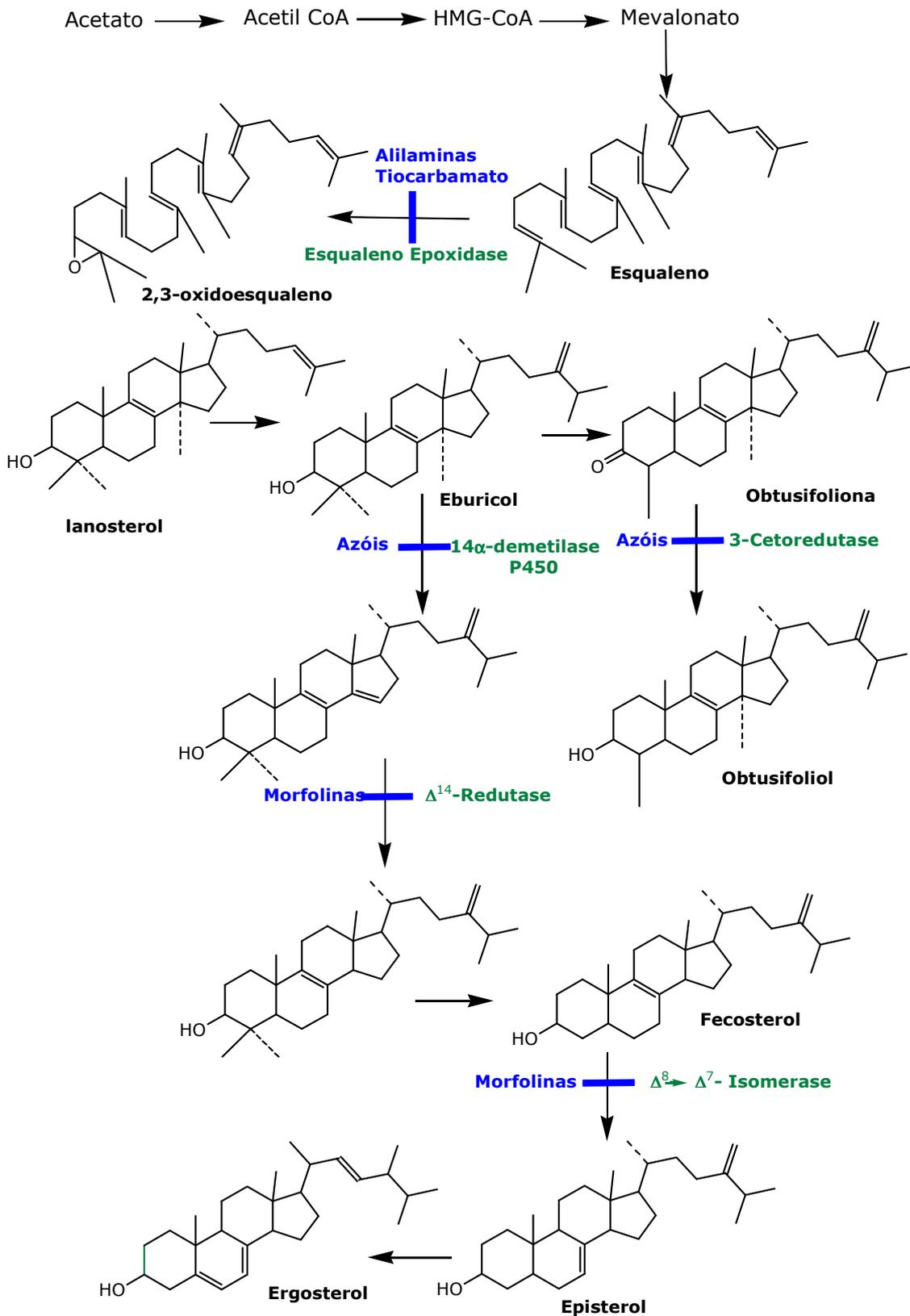


Figura 5. Etapas da Biossíntese do Ergosterol e Alvos Moleculares dos Fármacos que atuam nesta biossíntese.

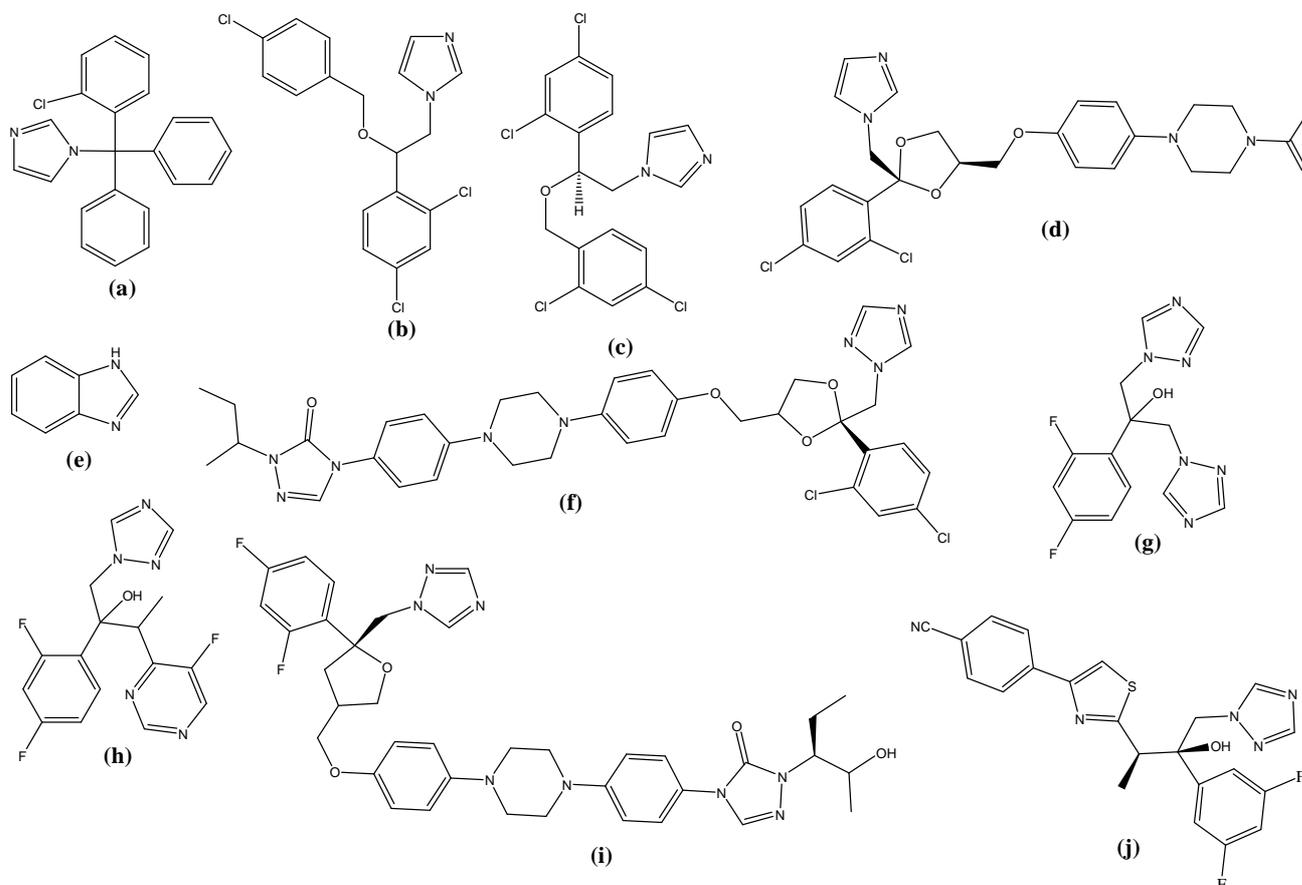
As morfolinas inibem duas enzimas na etapa de biossíntese de ergosterol,  $\Delta^{7,8}$ - isomerase (ERG24) e  $\Delta^{14}$ - redutase (ERG2) (**Figura 5**) (Vanden Bossche *et al.*, 1994; Vandeputte *et al.*, 2012). Nesta classe de compostos, destaca-se amorolfina (**Figura 4**) que é um fungicida utilizado contra uma série de fungos em cereais além de apresentar amplo uso contra fungos dermatófitos. O mecanismo de resistência deste grupo de substâncias ainda é desconhecido (Vandeputte *et al.*, 2012).

Os derivados azólicos (**Figura 6**), também pertencentes à classe de EBIs, são os mais amplamente utilizados, devido à sua boa tolerância no organismo humano, no combate aos fungos patógenos (Vanden Bossche *et al.*, 1994; Vanden Bossche, 1997). O primeiro azol sintetizado em 1944 por Woolley (Woolley, 1944) foi o Benzimidazol, porém, somente, a partir de 1958, que a comunidade científica começou a considerar os azóis como potenciais antifúngicos (Vandeputte *et al.*, 2012). Nos anos 60, clotrimazol, econazol e miconazol (**Figura 6**) começaram a ser avaliados para tratamento, mas o uso destes ficou restrito a tratamento externo devido a sua alta toxicidade quando administrados oralmente (Fromtling, 1988; Vandeputte *et al.*, 2012). Até os anos 80, casos de resistência a tais antifúngicos eram raros, no entanto, estudos de atividade mostraram diferenças no espectro de ação de cada fármaco azólico, ou seja, na susceptibilidade de algumas cepas da mesma espécie diante de um mesmo fármaco (Vanden Bossche *et al.*, 1994).

Todos os derivados azólicos apresentam mecanismo de ação relacionado à inibição da enzima citocromo P450 14 $\alpha$ -demetilase (ERG11) em uma etapa da biossíntese do ergosterol (Vanden Bossche, 1997; Vandeputte *et al.*, 2012). Os azóis, desta maneira, bloqueiam a produção de ergosterol e acumulam na célula fúngica um intermediário do esterol que é muito tóxico (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006; Cowen, 2008). A diferença na ação dos azóis, imidazol ou tetrazol, está na espécie de fungo onde cada fármaco atua e, na diferença entre influxo e efluxo de cada agente antifúngico naquela espécie (Vanden Bossche, 1997).

Dentre os derivados imidazólicos citados, destaca-se o cetoconazol (**Figura 6**), que foi desenvolvido por Heeres e colaboradores, e, em 1981, aprovado para uso clínico pelo órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*) (Heeres *et al.*, 1979; Vandeputte *et al.*, 2012). Este fármaco foi utilizado durante 10 anos para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, no entanto, devido a sua baixa absorção quando administrado oralmente, a formulação de cetoconazol foi desenvolvida sempre para administração intravenosa (Vandeputte *et al.*, 2012). Outros fatores limitantes do uso deste fármaco são: ele não pode cruzar a barreira cerebrospinal, ser menos ativo em pacientes imunocomprometidos (Van Der Meer *et al.*, 1980; Brass *et al.*, 1982; Perfect *et al.*, 1982; Fromtling, 1988; Vandeputte *et al.*, 2012) e apresenta uma série de interações com outros fármacos (Vandeputte *et al.*, 2012). Devido a esta série de

desvantagens apresentadas pelo imidazol cetoconazol, os triazóis, que são biosósteros destes, começaram a ser estudados (Vandeputte *et al.*, 2012).



**Figura 6. Estrutura química dos principais antifúngicos EBI's, cinco imidazóis: clotrimazol (a), econazol (b), miconazol (c), cetoconazol (d) e benzimidazol (e); cinco triazóis: itraconazol (f), fluconazol (g), voriconazol (h), posaconazol (i) e ravuconazol (j).** (Figura adaptada de Vandeputte, P. e colaboradores, Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections, *Int J Microbio*, 2012).

Em 1990, o fluconazol (**Figura 6**) começou a ser utilizado clinicamente, apresentando frente aos imidazóis uma série de vantagens (Vandeputte *et al.*, 2012): o fluconazol é altamente hidrossolúvel, pode ser facilmente administrado intravenosamente (Arndt *et al.*, 1988; Brammer *et al.*, 1990; Vandeputte *et al.*, 2012), é completamente absorvido pelo trato gastrointestinal, se difundindo por todo o corpo, inclusive pelo líquido cefalorraquidiano. Fluconazol é usado para tratamento de candidíases superficiais (orofaringe, esôfago e vaginal), candidíases disseminadas, meningites criptocócicas, coccidioidomicosis e candidíases cutâneas (Vandeputte *et al.*, 2012). Devido a suas boas qualidades farmacocinéticas e ao amplo espectro de atuação, fluconazol foi considerado durante os anos 90 "the gold-standard" para o

tratamento de infecções fúngicas, embora devido ao seu uso indiscriminado, já foram observados casos de resistência a este fármaco (Vandeputte *et al.*, 2012).

O itraconazol (**Figura 6**) foi aprovado pela FDA em 1992, possui um amplo espectro de atuação quando comparado com o cetoconazol e mais amplo do que fluconazol. Além de ser menos tóxico que cetoconazol, tendo substituído este fármaco no tratamento de histoplasmose, blastomicose e paracoccidioidomicose (Vandeputte *et al.*, 2012); o itraconazol também é utilizado no tratamento contra espécies do gênero *Aspergillus* e *Sporotrix*, fungos não-susceptíveis ao fluconazol (Espinel-Ingroff *et al.*, 1984). No entanto, o itraconazol é mais hidrofóbico e mais tóxico que o fluconazol (Vandeputte *et al.*, 2012).

Apesar das vantagens apresentadas pelo fluconazol e pelo itraconazol, eles não são antifúngicos perfeitos, pois apresentam interação com alguns fármacos utilizados no tratamento de AIDS e em quimioterapia (Vandeputte *et al.*, 2012). Além disso, ambos os fármacos não são efetivos no tratamento contra patógenos emergentes como *Scedosporium*, *Fusarium* e *Mucorales* e vem sendo observado e amplamente divulgada a resistência a azóis (Denning *et al.*, 1997).

A nova geração de triazóis, constituída por voriconazol e posaconazol (**Figura 6**), que foram aprovados respectivamente, pela FDA, em 2002 e 2006 (Vandeputte *et al.*, 2012), apresentam uma ampla ação contra espécies do gênero *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Scedosporium*, *Acremonium* e *Trichosporon*, além de fungos dimórficos, dermatofitos e *Cryptococcus neoformans* (Chiou *et al.*, 2000; Sabo e Abdel-Rahman, 2000). Estes fármacos também são mais efetivos contra *Candida* e *Aspergillus*, quando comparados com os triazóis clássicos (Chiou *et al.*, 2000), porém as interações com outros fármacos são similares às apresentadas pelo fluconazol e itraconazol e os fungos que apresentam resistência a estes medicamentos também apresentam resistência cruzada aos triazóis de nova geração (Vandeputte *et al.*, 2012).

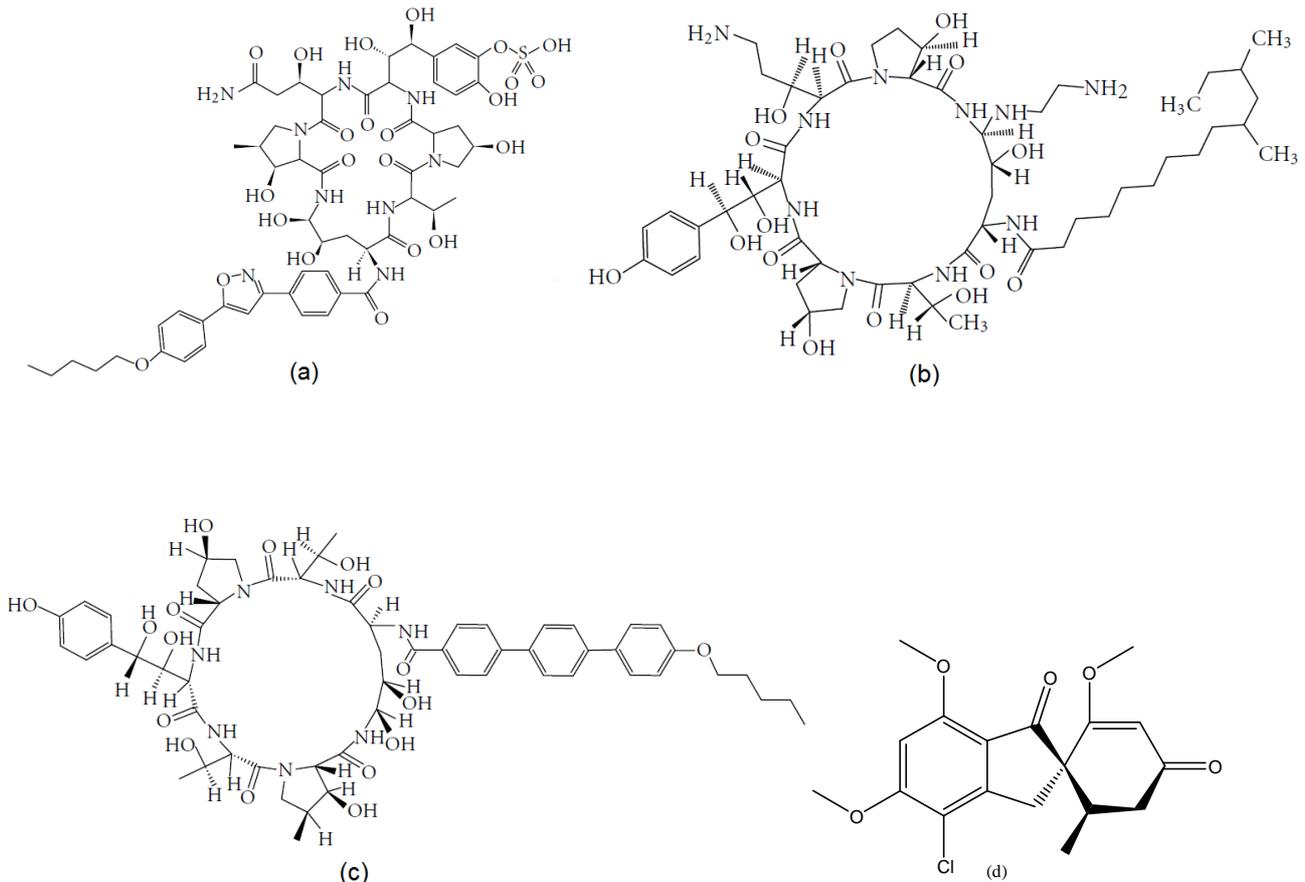
Uma vez conhecido o mecanismo de ação destes EBIs, se torna importante o conhecimento dos fatores que levam à resistência a tais agentes antifúngicos. A resistência aos azóis muitas vezes está ligada à regulação de algumas famílias de proteínas responsáveis pelo transporte de substâncias para dentro da célula (classe facilitadora - em inglês: "*major facilitator class*", uma família de proteínas que utiliza energia proveniente da remoção de um próton para o transporte de substratos através da membrana) (Cowen, 2008). Por exemplo, já tem sido comprovado que esta classe de proteínas tem sido responsável pela resistência a fluconazol em espécies de *Candida* e *Aspergillus* (da Silva Ferreira *et al.*, 2004; Coste *et al.*, 2007). Outra classe de proteínas que conferem resistência a múltiplos azóis e outros fármacos são os transportadores ABC (*ATP Binding Cassete*) (Sanglard e Odds, 2002; Cowen, 2008), uma família de proteínas

que mede a resistência via dependência da energia provinda da hidrólise de ATP (trifosfato de adenosina) impedindo que o fármaco atinja a dose terapêutica na célula do fungo (Cowen, 2008).

Além destes fatores, a mutação genética pode gerar a resistência de algumas espécies, por exemplo, tem sido relatada uma interessante mutação de amplificação do gene que confere a algumas cepas de *C.albicans* a resistência a azóis (Selmecki *et al.*, 2006; Cowen, 2008; Niimi *et al.*, 2010). Este mecanismo envolve a formação de um isocromossomo (um cromossomo anormal que possui um centrômero mediano e dois braços idênticos), em que um braço do cromossomo, que abriga ambos, possui um fator de transcrição que regula os transportadores ABC e um alvo dos azóis (ERG11) que é duplicado. Um outro fator que confere resistência à célula fúngica é alteração e amplificação do alvo do fármaco que minimiza a sua ação na célula; isto tem sido relatado em espécies de *Candida* e *Aspergillus* (Niimi *et al.*, 2006). Alterações nos genes responsáveis pela síntese do ergosterol conferem mudanças na etapas da biossíntese do mesmo e aumentam a resistência a azóis; por exemplo, a perda de função de ERG3, bloqueia o acúmulo do ergosterol tóxico que pode ocorrer se ERG11 é acumulado (**Figura 4**) (Cowen, 2008).

#### **1.3.4- Equinocandinas: Mecanismos de Ação e Limitações**

Uma classe mais recente de agentes antifúngicos tem sido utilizada clinicamente nos últimos 15 anos: a classe das equinocandinas (Vandeputte *et al.*, 2012). Três equinocandinas são aprovadas pela FDA para uso: caspofungina (desde 2001), micafungina (desde 2005) e anidulafungina (desde 2006) (**Figura 7**). As equinocandinas são derivados sintéticos de lipopeptídeos que são produzidos por uma série de fungos: *Aspergillus Rugulovalvus*, *Zalerion arborícola*, *Papularia sphaerosperma* (Vandeputte *et al.*, 2012). Devido à sua alta massa molecular estes fármacos só podem ser administrados intravenosamente (Vandeputte *et al.*, 2012). Estas moléculas apresentam baixa toxicidade (raros efeitos colaterais relatados), são lentamente degradadas, uma dose diária já se mostra suficiente, ao contrário de outros antifúngicos, e apresentam baixa interação com outros fármacos (Denning, 2002; Vandeputte *et al.*, 2012).



**Figura 7. Estrutura química de três equinocandinas utilizadas clinicamente: micafungina (a), caspofungina (b) e anidulafungina (c); (d) griseofulvina.** (Figura adaptada de Vandeputte, P. e colaboradores, Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections, *Int J Microbio*, 2012).

Equinocandinas apresentam atividade contra a maior parte dos fungos, sendo a fungicida contra *Candida* e fungistática contra *Aspergillus* (Vandeputte *et al.*, 2012). No entanto, equinocandinas não apresentam atividade contra *C. neoformans* e espécies do gênero *Trichophyton* e *Fusarium* (Feldmesser *et al.*, 2000; Vandeputte *et al.*, 2012). Mesmo assim, equinocandinas são uma boa alternativa para o tratamento da maior parte das infecções em que o tratamento com azóis e polienos falha (Vandeputte *et al.*, 2012). Caspofungina é indicada para a profilaxia no tratamento de candidemia e candidíase invasiva e para o tratamento de aspergilose quando itraconazol, voriconazol ou AMB são ineficazes (Vandeputte *et al.*, 2012).

As equinocandinas são inibidores não-competitivos de  $\beta(1,3)$ -glucano sintetase (**Figura 2**), enzima que catalisa a polimerização de  $\beta(1,3)$ -glucano, um componente estrutural responsável pela integridade e rigidez da parede celular do fungo (Pfaller, 2012). A inibição de  $\beta(1,3)$ -glucano sintetase leva a desabilitação da parede celular e o vazamento de componentes intracelular, resultando na desintegração da célula (Stone *et al.*, 2002; Vandeputte *et al.*, 2012).

De fato, a resistência a equinocandinas é rara, mas a mutação no alvo das equinocandinas (FKS1) é um comum mecanismo de resistência a estes fármacos (Perlin, 2007; Cowen, 2008). Tal mutação minimiza o impacto do fármaco na parede celular do fungo (Cowen, 2008). Este mecanismo de resistência já foi demonstrado para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* e gera uma resistência cruzada a toda a classe de equinocandinas (Pfaller, 2012). Cabe ressaltar que a resistência de *C. glabrata* a equinocandinas tem sido associada mutações no gene FKS2 (Katiyar *et al.*, 2006). A resistência de *C. neoformans* a tais fármacos não está ligada a mutação de FKS1 e FKS2, mas sim à diferente composição de polissacarídeos da parede celular desta espécie (Vandeputte *et al.*, 2012).

### **1.3.5- Griseofulvina: Mecanismos de Ação e Limitações**

A griseofulvina é um antifúngico, de uso limitado a fungos dermatófitos, que foi primeiramente isolada, em 1939, por Oxford e colaboradores à partir do fungo *Penicillium griseofulvum* (Decarli e Larizza, 1988). Todavia, o maior interesse neste antifúngico se deve ao seu diferenciado mecanismo de ação que envolve a inibição da mitose celular, com alteração o processo de escoamento dos microtúbulos que é necessário para a separação dos cromossomos (Decarli e Larizza, 1988). Apesar da baixa toxicidade, esta substância também tem o seu uso limitado por seu efeito carcinogênico.(Decarli e Larizza, 1988)

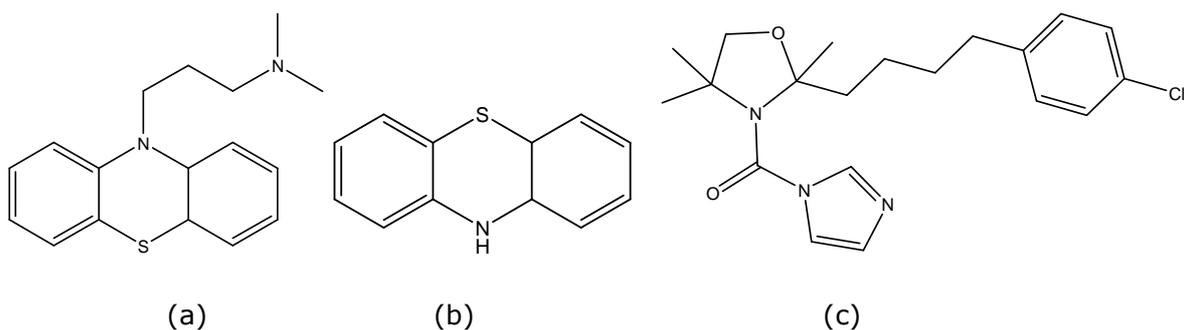
### **1.3.6- Moduladores de Resistência a Antifúngicos**

Tendo em vista tudo o que foi exposto no contexto de resistência aos antifúngicos, é importante ressaltar o aparecimento de cepas que apresentam resistência a múltiplos fármacos (MDR - *Multi Drug Resistance* - termo utilizado para descrever o fenômeno de resistência que alguns tumores que apresentam diante de um determinado grupo de fármacos), sendo este

fenômeno relacionado, principalmente, à questão da baixa concentração do fármaco no meio celular devido à superexpressão gênica de transportadores ABC que aumentam o efluxo do fármaco da célula patogênica. Destaca-se, o fenômeno de MDR nas infecções com *C. glabrata* frente à 5FC, fluconazol e voriconazol, além disso, há outros casos nos quais nenhum azol ou mesmo AMB foram adequados para terapia contra esta espécie (Cowen, 2008; Pfaller, 2012).

A descoberta de que MDR também atuam na resistência a antifúngicos é recente quando comparada ao câncer e tem sido estudada, mundialmente, por pesquisadores na área de micologia aplicada. Por exemplo, espécies de *C. albicans* expressam transportadores responsáveis pelo efluxo de múltiplos fármacos (MET, "multidrug efflux transporter"), principalmente pertencentes à classe de transportadores ABC e proteínas pertencentes à superfamília "major facilitator" (MFS) presentes na parede celular do fungo. METs mediam o efluxo de uma série de agentes antifúngicos, entre tais, o fluconazol. Como veremos a seguir, em mamíferos, a desregulação de genes também pertencentes à família ABC estão relacionados à MDR ao câncer (Marchetti *et al.*, 2000).

Pesquisadores vêm investigando o uso de terapia combinatória na presença de substâncias que possam otimizar a atividade do fármaco mantendo a dose terapêutica pela modulação de MDR. Marchetti e colaboradores (Marchetti *et al.*, 2000) estudaram o uso de ciclosporina (Cy-modulador MDR conhecido) com fluconazol e mostraram que as linhagens de *C. albicans* resistentes a FLC (fluconazol), que outrora apresentaram MICs  $>32 \mu\text{g.L}^{-1}$  diminuíram para  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; este efeito só foi observação conjunta de Cy com FLC. Outras classes de compostos com atividade moduladora de MDR para fungos patogênicos tem sido clorpromazina e fenotiazina combinadas a oxpoconazol (**Figura 8**), um antifúngico muito utilizado na medicina veterinária (Morita e Assumpção, 1986; Hayashi *et al.*, 2003; Kolaczowski *et al.*, 2003).



**Figura 8. Estrutura química de duas substâncias usadas como moduladores de resistência a antifúngicos: (a) clorpromazina, (b) fenotiazina e estrutura do antifúngico oxpoconazol (c).**

Assim, com a crescente limitação da capacidade de tratar IFIs com os fármacos antifúngicos usuais, especialmente nos casos sistêmicos e com pequeno avanço no desenvolvimento de novas terapias antifúngicas, é imprescindível e urgente o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos ou de novas combinações de fármacos antifúngicos que possam ser eficientes e suplantar a resistência múltipla antifúngica que transforma as IFIs em grave problema de morbidade e mortalidade em pacientes tratados clinicamente. Agentes antineoplásicos ou anticâncer podem ser bom candidatos para a descoberta de novos agentes antifúngicos, sendo assim pode-se investigar paralelamente a atividade antifúngica e antitumoral de novas entidades químicas (Routh *et al.*, 2011). É destacável esta necessidade de descoberta de novas entidades químicas bioativas para o caso grave e emergente da resistência múltipla dos gêneros *Candida* e *Aspergillus* que são gêneros patogênicos que provocam 95 % das mais graves IFIs relacionadas à mortalidade (Sundriyal *et al.*, 2006; Pfaller, 2012; Vandeputte *et al.*, 2012).

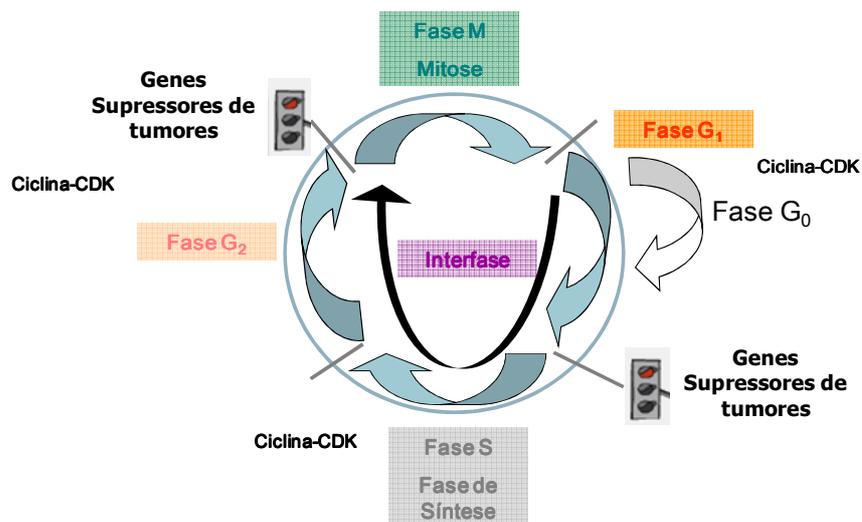
#### **1.4 - Anticancerígenos: Importância e Mecanismos de Ação e Resistência**

Um fator que aumenta o insucesso na terapia contra o câncer é a resistência aos fármacos antineoplásicos convencionais (MDR - *Multi Drug Resistance* - termo utilizado para descrever o fenômeno de resistência que alguns tumores apresentam diante de um determinado grupo de fármacos) (Krishna e Mayer, 2000), esta resistência pode ser intrínseca (no início do tratamento) ou adquirida (durante o tratamento). É digno destacar que a falha na quimioterapia é responsável por 90 % dos casos de morte relatados no mundo (Huber *et al.*, 2010), muitos destes casos estão relacionado à MDR. Existe uma série de mecanismos que descrevem MDR em células de mamíferos que podem ser classificados como mecanismos celulares e não-celulares e serão descritos no texto a seguir.

No entanto, primeiramente é preciso entender quais as diferenças básicas entre células cancerígenas e células comuns. Assim, será possível entender como os fármacos anticancerígenos agem e como eles falham. Estes pontos serão abordados a partir do próximo item.

### 1.4.1 - Ciclo celular e características bioquímicas da célula cancerígena

Uma célula comum dos mamíferos (eucariota) apresenta o ciclo celular descrito na **Figura 9**. Estas células são capazes de se dividir originando duas outras células filhas, o organismo destes seres, por sua vez, apresenta uma capacidade de inibir a proliferação de células que apresentam qualquer tipo de dano, este mecanismo é coordenado por um conjunto de enzimas chamadas quinases dependentes de ciclinas (CDK) que regulam todo o ciclo. A fase  $G_0$  é a fase final do desenvolvimento em que a célula encontra-se no estado quiescente (que é permanente para os neurônios) até o momento em que a mesma é estimulada por fatores de crescimento. Células que param de dividir devido ao envelhecimento ou a algum tipo de dano são chamadas sinescentes. Na fase  $G_1$  as células aumentam de tamanho, produzem RNA e proteínas, há nesta fase um importante conjunto de genes que controla o crescimento denominado genes supressores de tumor que checam se a célula está apta para passar para a próxima etapa. Na fase S ocorre a replicação do DNA. Na fase  $G_2$  a célula continua crescendo e produzindo proteínas e no final desta fase também agem os genes supressores de tumor. No final da fase  $G_2$  a célula entra em mitose (de Almeida *et al.*, 2005; Gabriel, 2007).

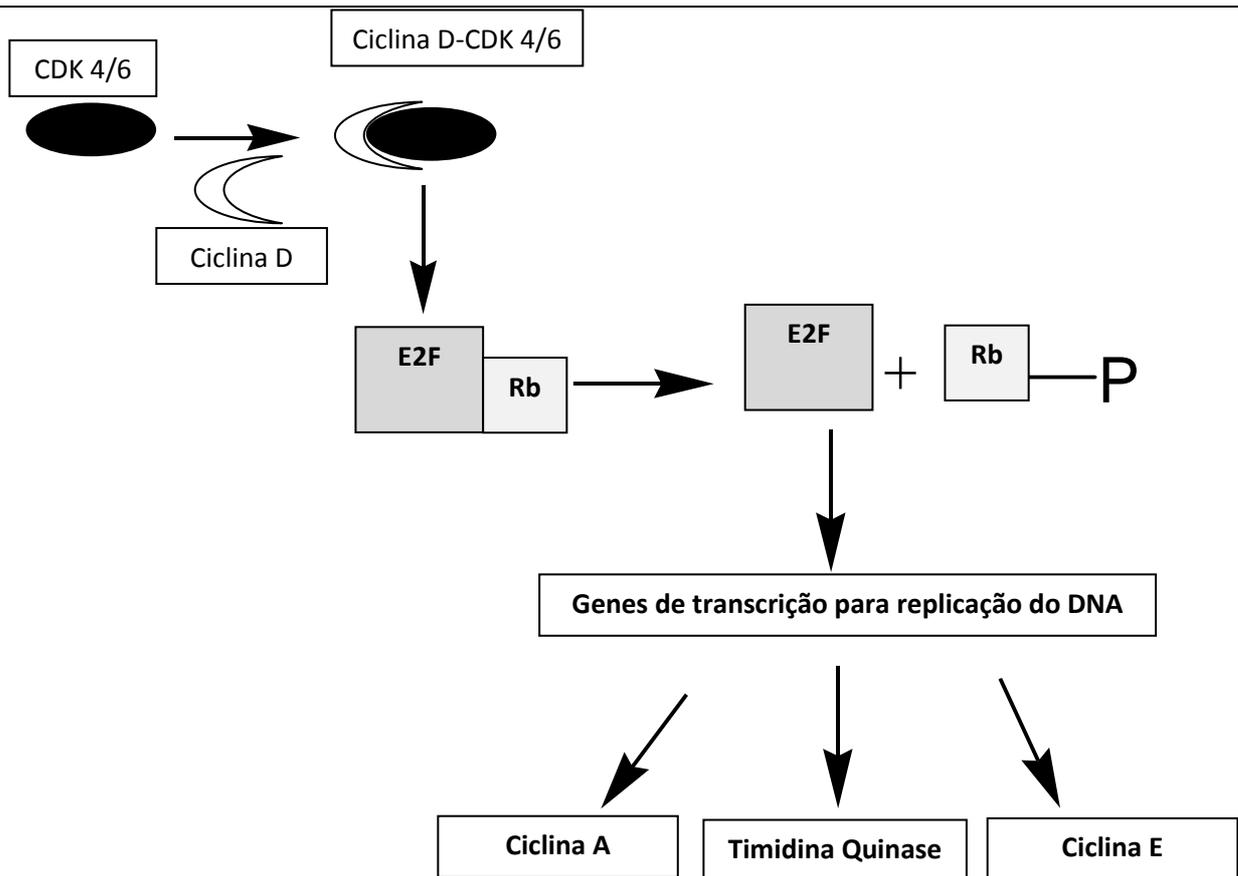


**Figura 9. Visão geral do ciclo celular dos mamíferos.**

A célula de câncer se divide e prolifera no organismo de maneira não controlada, o contrário ocorre na célula comum (**Figura 9**), que apresenta mecanismos de controle que podem detectar qualquer tipo de dano e provocar a morte programada da mesma por apoptose (Gabriel, 2007). As ciclinas e quinases dependentes de ciclinas fazem parte de um conjunto de proteínas localizadas no citoplasma que controlam o crescimento celular. A junção de ambas

forma um complexo ciclina-CDK que é ativado para que a célula continue a dividir, no entanto, quando um problema é detectado na célula a ativação deste não é completada. Uma vez ativado o complexo, um fator de transcrição também é ativado pela remoção do fator de inibição. Os fatores de transcrição ativam genes necessários para as próximas fases do ciclo celular incluindo genes ciclina e CDK (Gabriel, 2007).

Existem genes supressores de tumor que previnem o crescimento excessivo da célula, os mais conhecidos são o p53 e o gene retinoblastoma (Rb). Este último está envolvido com o final da fase  $G_1$  do ciclo celular (**Figura 10**) e se liga a um fator de transcrição conhecido como família  $E_{2F}$ , responsáveis pela replicação do DNA são reprimidos, além de impedirem a formação de ciclinas A e E, necessárias para o progresso no ciclo (Gabriel, 2007). A proteína p53 é essencial contra o câncer, sendo que mais da metade dos casos de devem à mutação desta; esta proteína sensibiliza o DNA danificado pondo um fim no ciclo celular. Se isto não ocorresse o DNA, apesar de danificado, seria replicado na fase S, o que poderia gerar uma mutação na proteína. Novamente, a ação das CDKs é crucial, primeiramente, em resposta a uma variedade de sinais de estresse (um exemplo dano no DNA) e ativa a p53. A transcrição do gene p21, que é um inibidor de CDK, é desencadeada e assim o ciclo celular termina (Gabriel, 2007). A proteína p53 está ainda envolvida no final da fase  $G_2$  ("checkpoint") em casos onde o DNA foi sintetizado incorretamente. Esta proteína liga-se à  $E_{2F}$  e previne a transcrição de proto-oncogenes, necessários para a mitose e que são importantes para promover o crescimento e divisão de uma célula normal, se estes sofrem mutação, são denominados oncogenes. Um simples oncogene não pode causar câncer, mas pode causar perda dos controles inibitórios no ciclo celular e também aumento da mitose. Quando a célula perde o controle sobre a mitose, pode-se desencadear o desenvolvimento de câncer (Gabriel, 2007). Existem mecanismos que podem reparar o DNA, mas quando estes falham a apoptose (também conhecida como a morte programada da célula) é uma alternativa.



**Figura 10. Mecanismo normal de crescimento celular** (Figura adaptada do livro de Gabriel, J. e outros, *The Biology of cancer*, 2ª edição, 2007).

Desta maneira, a célula comum tem mecanismos naturais para se defender da mutação. No entanto, quando o câncer desenvolve existem uma série de tratamentos disponíveis; estes dependem do estágio da doença e das condições físicas do paciente. Entre as terapias disponíveis estão: cirurgia, radioterapia, fotorradiação com derivados hematoporfíricos, laser e quimioterapia. No texto a seguir destacar-se-á o último método de terapia citado: a quimioterapia antineoplásica (Krishna e Mayer, 2000).

### 1.4.2 - Quimioterapia: Uma alternativa para o tratamento de câncer

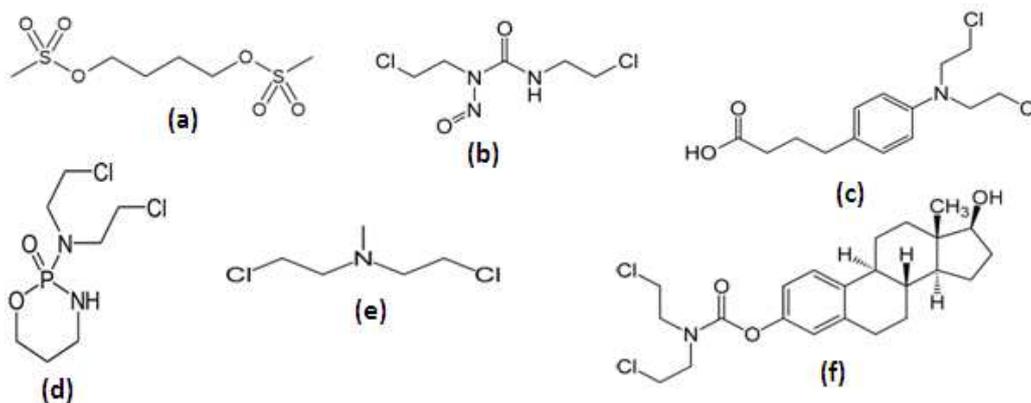
Em 2011, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considerou 27 medicamentos como sendo essenciais para o tratamento de câncer (**Anexo III**, página C) (WHO, 2011). O uso de medicamentos contra câncer é avaliado levando-se em conta a razão risco/benefício e nesta perspectiva, nos últimos anos, tem sido desenvolvida uma ciência responsável por avaliar a viabilidade do uso clínico de uma determinada substância: farmacoeconomia. Nesta ciência, ambos os fatores, econômicos e clínicos são levados em consideração quando se pensa em utilizar determinado fármaco (Gabriel, 2007).

Desta maneira, os medicamentos disponíveis para quimioterapia podem ser divididos em alguns grupos: (1) agentes alquilantes, (2) antibióticos e amsacrina, (3) antimetabólitos, (4) vinca alcalóides e etoposídeo, (5) taxanos, (6) camptotequinas, (7) agentes não-citotóxicos, (8) proteossomo inibidores, (9) anticorpos monoclonais etc. Nesta tese será destacado o mecanismo de ação dos agentes alquilantes, complexos de platina, antibióticos e alcaloides da vinca destacando a variedade de mecanismos de ação dos medicamentos disponíveis.

A maior parte dos medicamentos até hoje utilizados foram introduzidos na metade do século XX. Como já citado anteriormente, estes agentes se mostravam tóxicos não apenas diante de células malignas, mas também contra células saudáveis, como folículos capilares e epitélio gástrico, além de apresentarem uma série de efeitos adversos como perda de cabelo e mucosites (Spence e Jonhston, 2001; Gabriel, 2007). Assim, a necessidade de se entender os aspectos moleculares, tanto do tipo de tumor como dos alvos de determinado fármaco, se tornam importantes para viabilizar o desenvolvimento de um determinado medicamento. De fato, o entendimento da bioquímica do câncer levou ao desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos, cada vez mais ativos e menos tóxicos, além disso, como vimos no item **1.4.1**, o entendimento do ciclo celular tem uma enorme importância para o desenvolvimento de novos fármacos.

Os agentes alquilantes (**Figura 11**) são os antineoplásicos mais antigos empregados para o tratamento de câncer até hoje. Como o próprio nome já diz estes agentes são capazes de adicionar grupos alquila no DNA e são designados como agentes não-específicos no ciclo celular, ou seja, eles agem em mais de uma fase do ciclo, principalmente na fase S e bloqueia a fase G2 (de Almeida *et al.*, 2005). Tais fármacos podem ser utilizados para o tratamento de vários tumores, entre eles de cérebro, linfomas, mama, leucemias, sarcomas etc (de Almeida *et al.*, 2005; Gabriel, 2007).

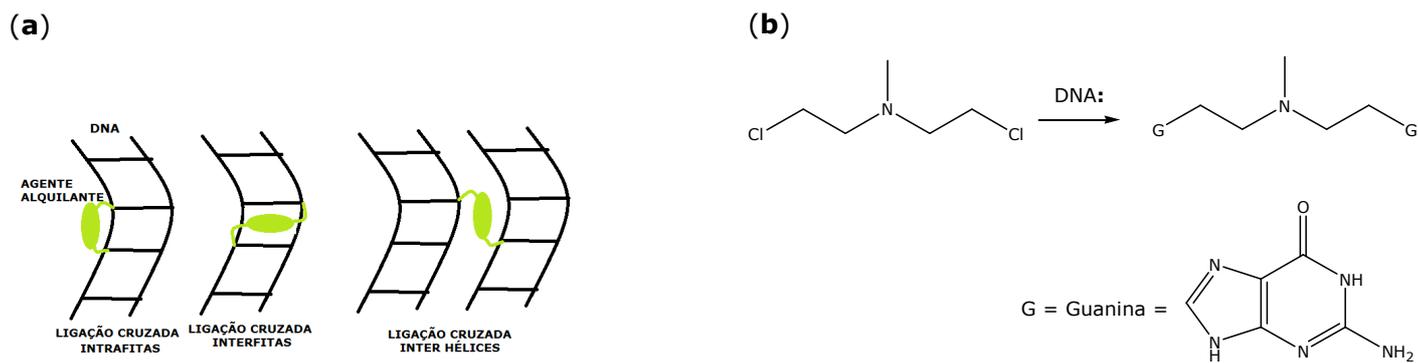
Mais detalhadamente, o mecanismo de ação dos agentes alquilantes (**Figura 12**) envolve formação de ligações covalentes com o DNA, tais fármacos reagem, principalmente, com a base nitrogenada guanina, além do fato da citosina e da adenina também poderem ser afetadas. Desta maneira, estes alquilantes podem se ligar a dupla hélice do DNA impedindo a replicação do mesmo. Além disso, o ataque das bases nitrogenadas pode resultar na fragmentação do DNA pela ação de enzimas reparadoras (de Almeida *et al.*, 2005; Gabriel, 2007).



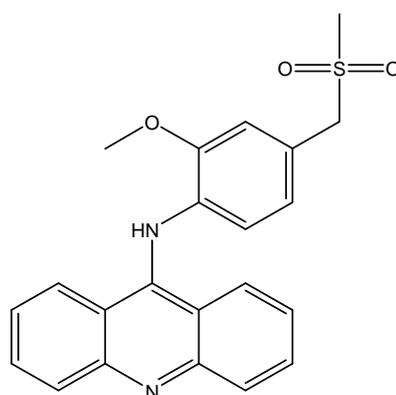
**Figura 11. Agentes alquilantes: (a) busulfan, (b) carmustina (BCNU), (c) clorambucil, (d) ciclofosfamida, (e) mecloretamina e (f) Estramustina.**

Os compostos de platina foram os primeiros a serem sintetizados (desde 1885), contudo, a atividade anticancerígena foi reconhecida apenas na década 1960. A ação dos compostos de platina é análoga à dos agentes alquilantes, no interior da célula eles formam complexos reativos que interagem com o DNA formando ligações intracadeia entre bases de guanina (**Figura 12**). Esta classe é amplamente utilizada no tratamento de câncer de bexiga, coloretal, gastrointestinal, ovário, cabeça, pescoço e pulmão (Gabriel, 2007).

A classe dos agentes antibióticos (dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina – **Anexo III**) e amsacrina (**Figura 13**) são produtos naturais que de uma maneira geral podem ter como mecanismo de ação: intercalação com o DNA, quebra do DNA, inibição de topoisomerase II (uma enzima responsável por desenrolar e reparar o DNA danificado), podem ainda afetar a atividade da enzima RNA polimerase etc. Amsacrina não é um antibiótico citotóxico, mas tem um mecanismo de ação similar, ela promove a ruptura da cadeia de DNA por intercalação, principalmente por pares adenosina e timina, além de afetar principalmente a fase S do ciclo celular. Esta classe de agentes anticancerígenos pode ser usada no tratamento de câncer de ovário, melanoma, mama, coloretal, mieloma e próstata (Gabriel, 2007).



**Figura 12. a) Algumas das ligações cruzadas que podem ocorrer entre um agente alquilante bifuncional e o DNA; b) Exemplos de produtos de alquilação do DNA (de Almeida *et al.*, 2005).**



**Figura 13. Estrutura molecular de amsacrina.**

Os alcaloides da vinca (exemplo, vinblastina e vincristina – **Anexo III**) originalmente são derivados da planta *Catharanthus roseus*. A atividade resulta da habilidade que esta classe de compostos apresenta de se ligarem a proteínas microtubulares presentes no fuso mitótico, o que leva a cristalização dos microtúbulos e impedimento da mitose. Mas apesar desta atividade, os alcaloides da vinca apresentam numerosos efeitos citotóxicos; esta classe de compostos é usada no tratamento de uma variedade de tumores incluindo cérebro, mama, linfoma e pulmão (Gabriel, 2007).

Apesar da imensa variedade de fármacos disponíveis para o tratamento de câncer, a terapia tem sido limitada pela resistência a tais fármacos. A resistência a tais fármacos (MDR) pode ser mediada por uma série de mecanismos. Porém, a natureza da resistência à quimioterapia e a relação desta com genes envolvidos no transporte do fármaco ainda não é muito clara. Existem vários fatores que podem determinar ou explicar a resistência a tais compostos, a seguir far-se-á a exposição de tais fatores por meio dos principais mecanismos de

resistência relatados na literatura: Mecanismo de resistência não-celular e celular (Krishna e Mayer, 2000; Xia e Lee, 2010).

### **1.4.3- Mecanismo de resistência não-celular**

O mecanismo de resistência não-celular envolve fatores extracelulares como vascularidade limitada ou ambiente de crescimento celular. Tal mecanismo é um indicativo de certos tipos de câncer que apresentam resistência (natural ou inerente) à quimioterapia desde a primeira aplicação (Xia e Lee, 2010); por exemplo, tumores sólidos podem apresentar baixa vascularidade o que pode dificultar o acesso do fármaco ao alvo de ação. Além disso, o ambiente onde se encontram os tumores apresenta hipoxia, baixa nutrição, ou um pH baixo devido à alta concentração de ácido láctico o que dificulta a ação de fármacos na forma de base fraca (Krishna e Mayer, 2000).

### **1.4.4- Mecanismo de resistência celular**

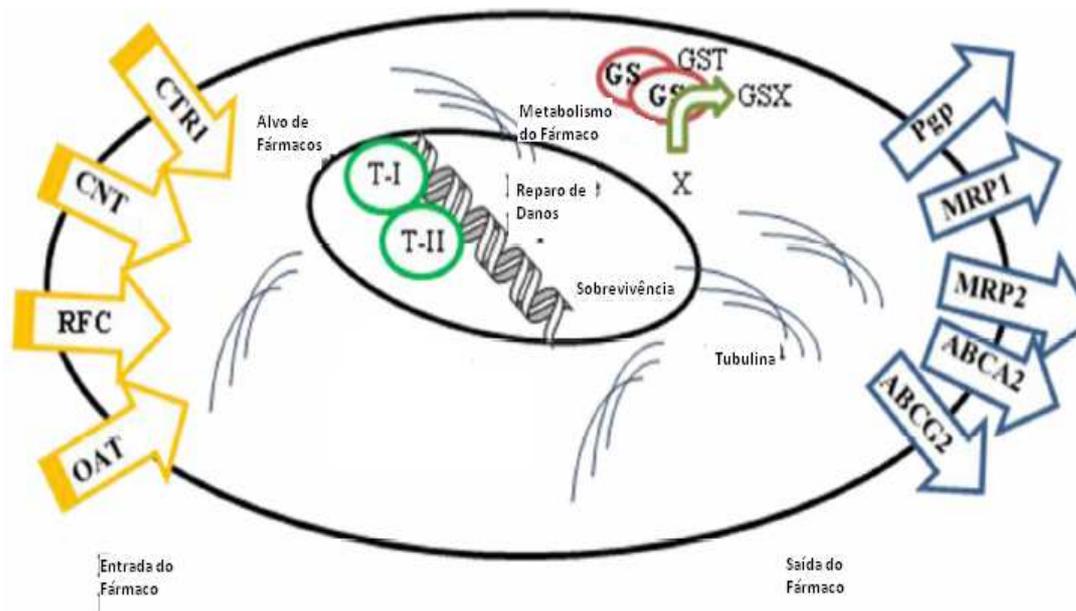
O mecanismo de resistência celular (**Figura 14**) pode ser dividido em clássico e não-clássico. O **mecanismo não-clássico** é utilizado para descrever fenômenos de MDR que não dependem do transporte do fármaco no meio celular. Este tipo de resistência se relaciona, por exemplo, com a alteração de algumas enzimas (como glutathione S-transferase, GST, e topoisomerase), que diminuem a citotoxicidade do fármaco sem alterar a concentração do mesmo no meio intracelular. Mudanças no balanço de proteínas que regulam a apoptose podem reduzir a quimiossensibilidade a alguns fármacos cujo mecanismo de ação atue nesta etapa do ciclo celular (Krishna e Mayer, 2000; Xia e Lee, 2010).

A GST é uma enzima que atua na desintoxicação do organismo por meio da biotransformação principalmente de moléculas orgânicas que são conjugadas pela enzima com a glutathione, resultando em moléculas mais polares e excretáveis (Xia e Lee, 2010). Entre outras funções importantes, GST protege a célula de epóxidos tóxicos e também protege a célula de danos causados por radicais livres. Entre as substâncias anticancerígenas metabolizadas por GST as mostardas nitrogenadas, como BCNU (carmustina) e ciclofosfamidas (**Figura 11**). Linhagens resistentes mostraram um aumento na atividade de GST, por exemplo no caso de resistência a clorambucil (Krishna e Mayer, 2000).

Quanto ao mecanismo de resistência celular envolvendo topoisomerase, existem dois tipos de topoisomerase nas células dos mamíferos (Topoisomerase I e II), ambas envolvidas no processo de replicação do DNA, por isso, estes são alvos para alguns fármacos. No entanto, pode ocorrer resistência aos inibidores de topoisomerase II devido à mutação no gene de topoisomerase II e/ou baixa expressão da mesma. Por outro lado o aumento da expressão do gene de topoisomerase I foi observado em células resistentes a inibidores de topoisomerase II (Krishna e Mayer, 2000).

Fármacos anticancerígenos, geralmente, induzem as células à morte programada ou à apoptose, esta forma de morte celular é caracterizada pela condensação celular dentro da célula, levando à fragmentação do DNA. O crescimento celular é regulado por uma série de proteínas e genes e sugere-se que o gene supressor de tumor, p53, não apenas induz o impedimento da fase G1 do ciclo celular e apoptose do DNA danificado, como também regula a expressão de proteínas que promovem a apoptose, com bcl-2 e bax. A resistência neste caso pode ocorrer pela perda de genes responsáveis pela morte celular como p53 ou aumento da expressão de genes que bloqueiam a morte celular (Krishna e Mayer, 2000).

O **mecanismo clássico** de MDR envolve a diminuição da concentração do fármaco devido a ação de uma série de proteínas, localizadas nas membranas celulares, responsáveis pelo transporte de substâncias (Xia e Lee, 2010). Algumas linhagens de células têm apresentado baixa concentração do fármaco, o que impede que este atinja a dose terapêutica. A resistência a múltiplos fármacos, baseada nos transportadores clássicos é um dos mecanismos celulares mais estudados atualmente. A família de proteínas ABC apresenta um mecanismo de transporte dependente de ATP. Em células humanas os genes *mdr1* e *mdr2* têm sido caracterizados. O primeiro gene citado, *mdr1*, é expressado pela glicoproteína-P (GP-P), que promove o efluxo do agente quimioterápico. Outra proteína transportadora associada ao fenômeno de resistência MRP1 (proteína resistente a múltiplos fármacos), está localizada predominantemente na membrana plasmática (Krishna e Mayer, 2000; Huber *et al.*, 2010)



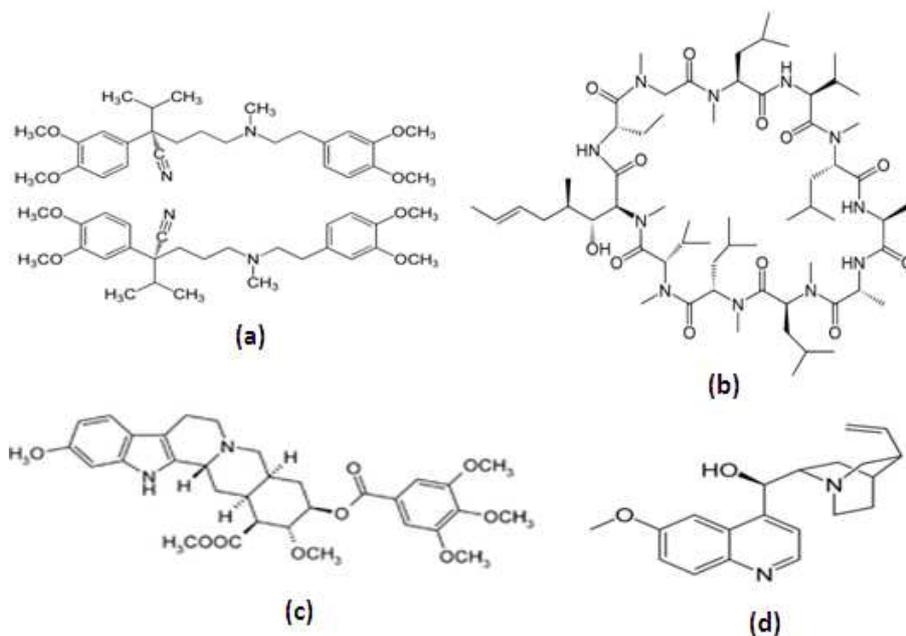
**Figura 14. Mecanismos celulares de MDR: OAT: transportadores de ânions orgânicos, CTR1: proteína membrânica integral homotrimerica que transporta cobre reduzido ( $\text{Cu}^+$ ), CNT: transportador de nucleotídeo concentrativo, RFC: carreador de folato reduzido conhecido como transportador metotrexato. Alvos para quimioterapia, DNA, tubulina, topoisomerases I e II (TI e TII). ABC: ATP Binding cassette; MRP1, MRP2: Proteínas associadas a resistência aos fármacos; P-gp: ABCB1 (Figura adaptada do artigo de Xia Y., 2010, Biomolecules & Therapeutics, 18, 375-385).**

Já foi discutido que o câncer pode ser tratado, principalmente, por cirurgia, radioterapia e quimioterapia. No entanto, uma grande parte deste conjunto de doenças apresenta resistência diante do tratamento quimioterápico, o que dificulta a cura. Os casos de MDR já foram caracterizados, e, entre todos os citados, o mais amplamente estudado e importante envolve o aumento da expressão de GP-P (Xia e Lee, 2010). É digno de nota, que atualmente o aumento da resistência aos fármacos tem sido o foco de estudo da comunidade científica, destacando-se que os mecanismos celulares são os mais estudados em detalhe. As indústrias farmacêuticas têm investido em pesquisas no desenvolvimento de moduladores de resistência baseados no mecanismo celular. Tais pesquisas envolvem principalmente o estudo de moduladores da família transportadores que é, na maior parte dos casos, a grande responsável pelos casos relatados de MDR: os transportadores ABC. Dentro desta família a proteína mais estudada é GP-P, desta maneira nos últimos anos tem se intensificado o estudo de inibidores de tal proteína, este tema será abordado a seguir.

#### **1.4.5- Moduladores de resistência mediada por GP-P**

Encontrar métodos que impeçam o desenvolvimento de MDR tem sido o foco de uma série de pesquisas no mundo inteiro e os compostos que apresentam a capacidade de reverter a resistência são chamados de inibidores de MDR ou moduladores de MDR (Xia e Lee, 2010). Em geral, o tratamento de câncer que apresenta resistência se dá com co-administração de um agente modulador de MDR juntamente com o anticancerígeno e existem vários grupos de substâncias que podem apresentar modulação de MDR de GP-P, entre estes: bloqueadores de canais de cálcio, vasodilatadores, alcalóides indóis, quinolinas, hormônios, ciclosporinas, surfactantes e anticorpos. Estes grupos de uma maneira geral são classificados como de primeira, segunda e terceira gerações (Huber *et al.*, 2010).

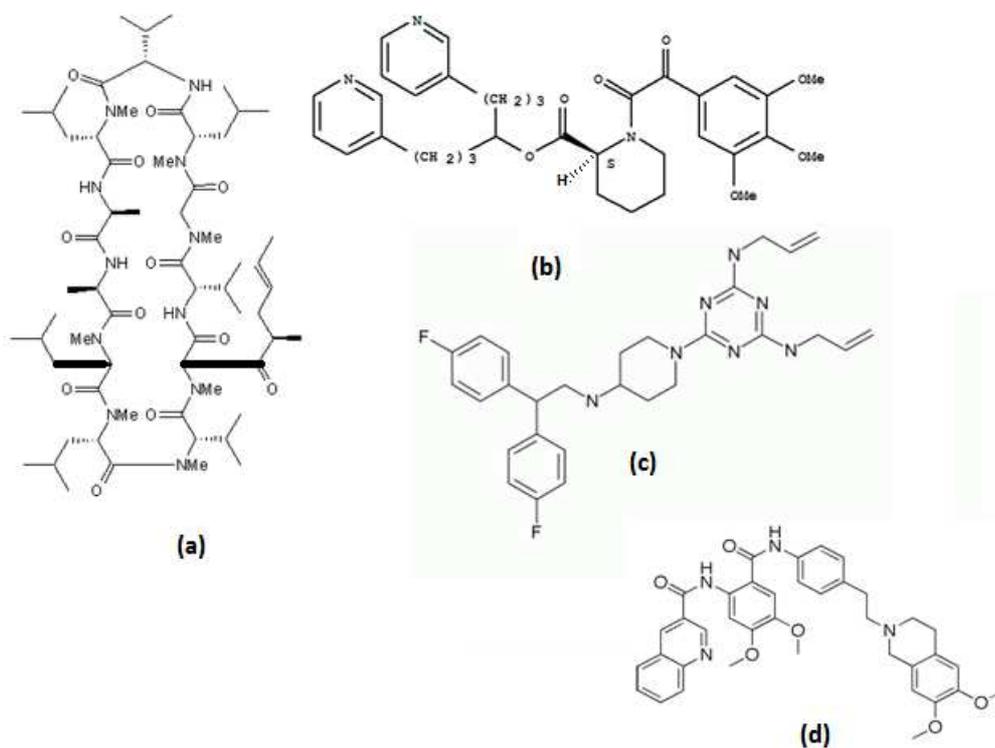
Os chamados moduladores MDR de primeira geração incluem compostos de diversas estruturas e funções, como bloqueadores de canais de cálcio (verapamil), imunossuppressores (ciclosporina A), antibióticos (eritromicina), alcalóides indólicos (reserpina) antimalária (quinina) etc. Apesar das estruturas serem bem diferentes, estes compostos apresentam em geral algumas semelhanças, como nitrogênio trissubstituído, muitas delas são moléculas anfipáticas, apresentam um sistema planar ou um sistema de anéis (**Figura 15**). Os primeiros moduladores de resistência foram desenvolvidos, em 1983, por Tsuru e colaboradores (como relatado por Krishna e colaboradores) (Krishna e Mayer, 2000), estes autores demonstraram que verapamil (VRP) bloqueia os canais de cálcio revertendo a MDR e desta maneira VRP potencializa a atividade anticancerígena de alguns agentes anticancerígenos como doxorubicina (DOX).



**Figura 15. Inibidores de MDR de primeira geração: (a) verapamil, (b) ciclosporina A, (c) reserpina, (d) quinina**

Cabe ainda ressaltar que os moduladores de MDR de primeira geração apresentam outras atividades farmacológicas e não foram desenvolvidos especificamente com a finalidade de inibir MDR. A afinidade com os transportadores ABC é baixa e por isso é necessária uma alta dose do fármaco, o que aumenta a sua toxicidade. Devido a essas principais limitações, foi promovida a necessidade de desenvolver novos moduladores, mais potentes, menos tóxicos e mais seletivos à GP-P (Xia e Lee, 2010). Três dos inibidores MDR de segunda geração (PSC833, VX-710 e S9788 – **Figura 16**) progrediram para fases clínicas I e II, no entanto, tais substâncias mostraram sérias limitações: o bloqueio de GP-P resultou na elevação dos níveis de anticancerígeno no plasma e alteraram as propriedades farmacocinéticas e de biodistribuição dos fármacos anticancerígenos, isto gerou elevação da toxicidade dos mesmos e necessidade de redução da dose administrada, a redução da dose, entretanto, resultou na redução da eficiência do anticancerígeno (Krishna e Mayer, 2000; Xia e Lee, 2010).

As moléculas de terceira geração, que atuam especificamente inibindo GP-P e não inibem outros transportadores ABC, foram desenvolvidas para suprir as limitações dos moduladores de segunda geração. Assim, tais substâncias podem ser administradas juntamente com os anticancerígenos sem reduzir a dose terapêutica. Um promissor modulador MDR é o taquiridar que está na fase III de testes clínicos (Xia e Lee, 2010).



**Figura 16. Moduladores MDR de segunda geração: (a) PSC833, (b) VX-710, (c) S9788 e de terceira geração (d) taquiridar.**

É notável que a quimioterapia antineoplásica é complexa e uma série de fatores que devem ser considerados para o uso clínico: primeiramente é preciso entender como o fármaco pode atuar, depois entender as suas limitações e os fatores que podem limitar a ação do mesmo; por fim, pode-se planejar como melhorar a atividade biológica pelo uso de terapia combinada com moduladores MDR.

Nesta tese visando justamente suplantar a MDR, buscou-se o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais mais potentes como um dos focos centrais. Mais particularmente, buscou-se sintetizar compostos que possam vir a ser agentes antineoplásicos mais ativos e menos tóxicos do tipo tetrazólicos, tioureido e  $\alpha,\omega$ -diamino substituídos (com o objetivo de sintetizar novos complexos de platina).

## 2 – Justificativas, Relevância e Objetivos

### 2.1 - LASELORG-QUIM: Histórico do desenvolvimento de substâncias com atividade biológica

A busca de novas entidades químicas bioativas (NCEs – New Chemical Entities) com atividade potencializada e menor toxicidade é muito importante, como já visto, pelo grave problema de crescente resistência de tumores e de patógenos aos quimioterápicos clínicos usuais. Assim, o grupo de pesquisa LASELORG-QUIM (Laboratório de Síntese e Eletrossíntese Orgânica e Química Medicinal) tem se dedicado na síntese, caracterização e estudo da atividade biológica de novas classe de compostos, particularmente derivados  $\alpha, \omega$ -bis-funcionalizados. Estes compostos apresentam diversos grupos funcionais específicos para a atividade farmacológica esperada e estrutura proposta com o prévio planejamento racional por metodologias de modelagem molecular e de QSAR (de Almeida *et al.*, 2010). Além do mais, estas moléculas também não apresentam grande complexidade química ou estrutural para facilitar a sua obtenção. Mais especificamente, o LASELORG-QUIM tem se empenhado no desenvolvimento de novos agentes farmacológicos para o tratamento de doenças diversas que vêm apresentando crescente incidência e resistência à quimioterapia disponível, tais como o câncer, as doenças infecciosas emergentes (DIEs) e principalmente as infecções fúngicas invasivas (IFIs).

### 2.2 - Objetivos Gerais e Específicos

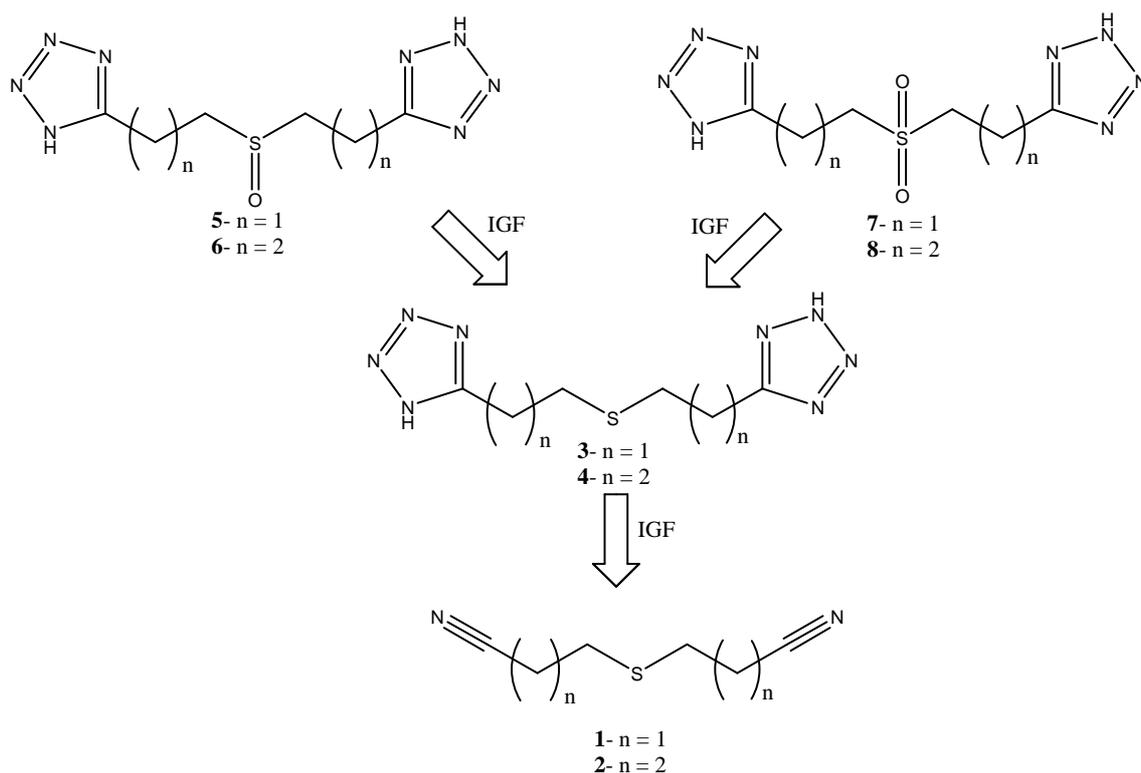
O LASELORG-QUIM (grupo o qual pertence a autora) tem investigado diversas classes de NCEs, o interesse inicialmente foi por compostos organossulfurados (COS) análogos aos presentes no alho – de estrutura geral  $Y(CH_2)_nS(O)_m-(CH_2)_nY$  – que demonstraram atividade antitumoral (Reina *et al.*, 2002), contudo já se tem observado que derivados similares apresentam atividade antifúngica, entre outras (Iciek *et al.*, 2009). Em outro trabalho também realizado no LASELORG-QUIM, investigou-se a síntese e atividade antitumoral de derivados azólicos, que são derivados heterocíclicos com ampla atividade farmacológica (Melo *et al.*, 2004). Posteriormente, as pesquisas do grupo se voltaram para o estudo da atividade farmacológica de derivados amidínicos – de estrutura geral  $R(C=NH)NH_2$  – e seus bioisómeros

(como, por exemplo, o grupo S-tioureido -  $R-S-(C=NH)NH_2$ , hidrazidas (ou acil hidrazinas,  $R(C=O)NHNH_2$ ), entre outros)(de Almeida *et al.*, 2005). De fato, os tioureido-derivados, têm apresentado destacável atividade antifúngica (Melo *et al.*, 2004; Silva, 2005; Nogueira, 2006; Nogueira *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011) e na dissertação de mestrado, anteriormente desenvolvida pela autora, também se constatou a atividade antifúngica de derivados análogos tioureido-funcionalizados (Oliveira *et al.*, 2011). Ressalta-se que foi observado que a atividade biológica destes compostos está relacionada com a lipofilia e a topologia da estrutura química e assim pretendeu-se, neste trabalho, ampliar o leque de outros possíveis grupos funcionais, como os tetrazóis e compostos organossulfurados e mesmo os tioureido-derivados e hidrazidas, em outras estruturas do tipo  $\alpha, \omega$ -bis-funcionalizadas que pudessem ser investigadas como NCEs com atividade antifúngica e antitumoral.

Cabe ressaltar que, recentemente, os pesquisadores envolvidos no desenvolvimento de novos fármacos vêm também investigando novos derivados bis-funcionalizados procurando um efeito sinérgico que aumente a seletividade e a potência, gerando menor toxidez e entre outras estratégias, criou-se o conceito de híbridos (ou quimeras farmacológicas) (Tietze *et al.*, 2003; Rapposelli, 2010). Estes são derivados mistos, ligados quimicamente, formados por duas substâncias com efeitos quimioterápicos similares, com a finalidade de formar uma NCE bioativa mais eficiente. Sendo assim, tornou-se de interesse, o estudo inédito da síntese e da atividade antimicrobiana e antitumoral de novos compostos formados entre bioisósteros de COS (sulfetos, éteres e furanos, ou tetra-hidrofuranos) funcionalizados com tetrazóis e com bioisósteros de amidinas (S-tioureidos e hidrazidas), que foram racionalizados previamente por estudos preliminares de modelagem molecular e QSAR, como no estudo da atividade antifúngica de derivados furânicos reportado recentemente (Almeida, 2011). Porém, como para a síntese de tetrazóis, seriam preparadas  $\alpha, \omega$ -dinitrilas, precursores de diaminas, que podem ser novos ligantes complexados com platina e que vem demonstrando não só aplicabilidade antitumoral, mas também antifúngica (Routh *et al.*, 2011), decidiu-se investigar a síntese e o estudo da atividade farmacológica destes.

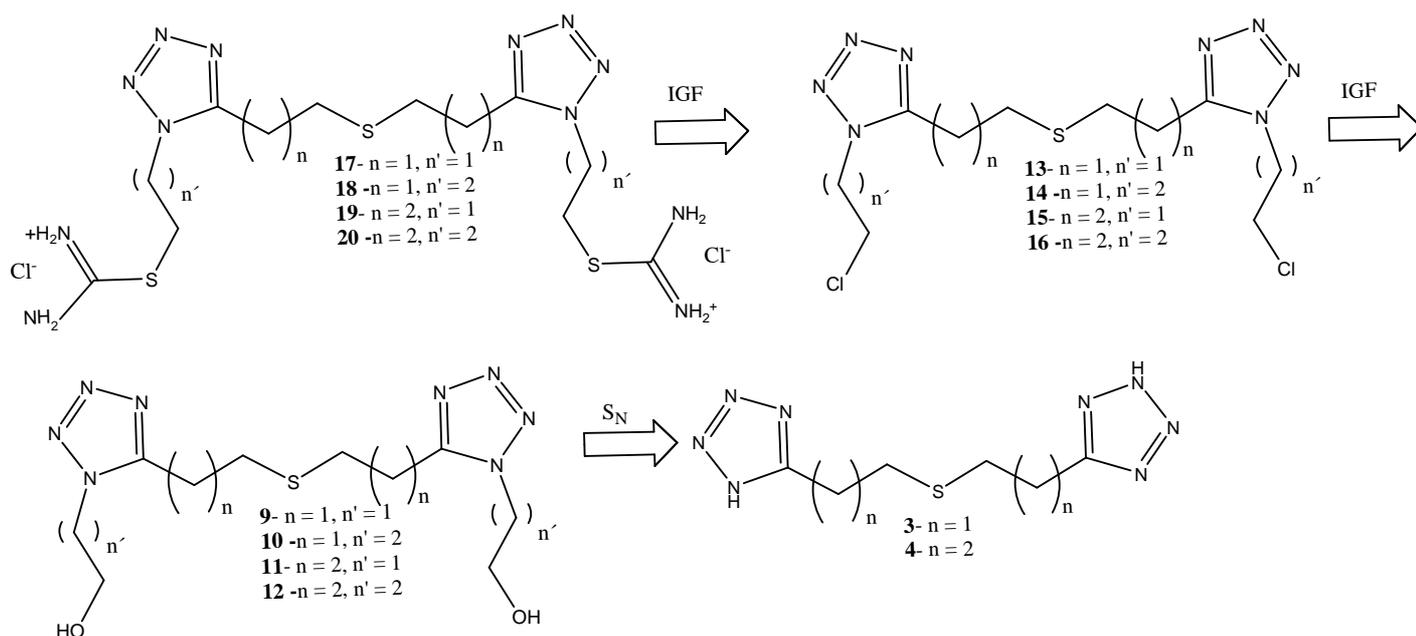
Assim, os objetivos específicos do trabalho desenvolvido nesta tese são:

a) Síntese (à partir de  $\alpha, \omega$ -dinitrilas preparadas - **1** e **2**) de novos derivados do tipo sulfetos  $\alpha, \omega$ -bis-tetrazólicos **3-8 (Figura 17)** com seus correspondentes isolamento e caracterização espectrométrica visando modificações moleculares bioisostéricas eficientes para o aumento da potência e a diminuição da toxidez, corroborados pelo prévio planejamento racional por métodos de QSAR e Modelagem Molecular;



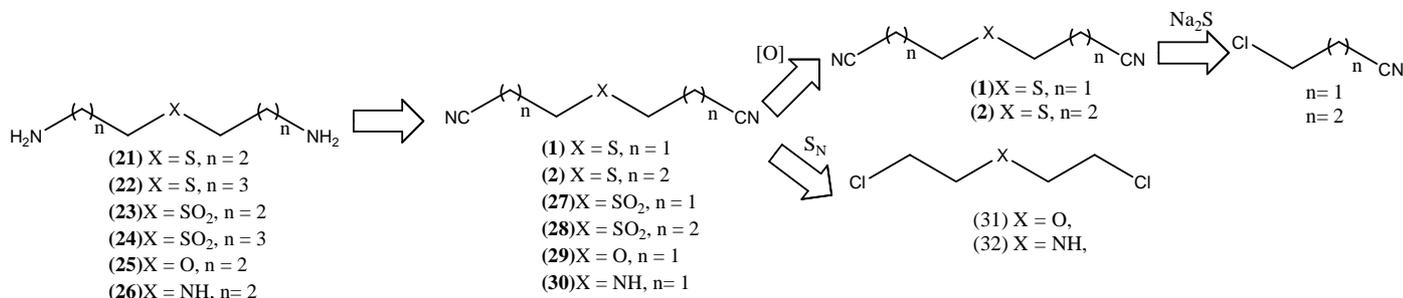
**Figura 17. Rota retrossintética de bis-tetrazóis obtidos.**

b) Síntese, isolamento e caracterização espectrométrica de novos derivados do tipo sulfetos  $\alpha,\omega$ -bis-tetrazólicos-*N*-alquil- $\alpha,\omega$ -S-bis-tioureido-substituídos **17-20** (**Figura 18 e Figura 24**), a partir dos correspondentes análogos *N*-alquil- $\alpha,\omega$ -di-hidróxi **9-12** e dos *N*-alquil- $\alpha,\omega$ -dicloro **13-16** visando a formação de outras novas quimeras pela introdução de unidades S-tioureido-substituídos nos anéis tetrazólicos;

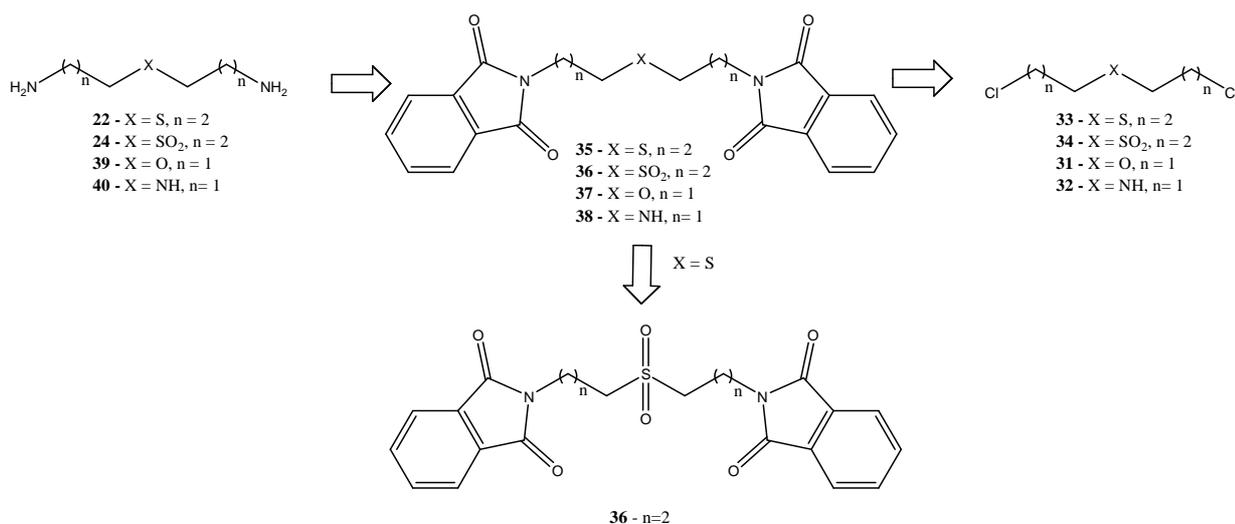


**Figura 18. Retrossíntese proposta para preparação de compostos bis-s-tioureidos-tetrazólicos.**

c) Obtenção de derivados  $\alpha,\omega$ -diamino-substituídos funcionalizados na cadeia carbônica central ( $\text{NH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_n\text{X}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{NH}_2$ - **Figura 19, 20 e 24**) - como sulfetos ( $\text{X}=\text{S}$ ) **21-22**, sulfonas ( $\text{X}=\text{SO}_2$ ) **23-24**, éteres ( $\text{X}=\text{O}$ ) **25** e **39** e amina ( $\text{X}=\text{NH}$ ) **26** e **40**- à partir de duas rotas sintéticas: i) Redução das nitrilas correspondentes ( $\text{NC}(\text{CH}_2)_n\text{X}(\text{CH}_2)_n\text{CN}$ , **1-2** ( $\text{X}=\text{S}$ ), **27-28** ( $\text{X}=\text{SO}_2$ ), **29** ( $\text{X}=\text{O}$ ) e **30** ( $\text{X}=\text{NH}$ )); sendo os derivados **1-2** preparados a partir da reação de correspondentes 3-cloropionitrila e 4-clorobutironitrila (comerciais- *Aldrich*<sup>®</sup>); os derivados **27** e **28** obtidos através da oxidação de **1** e **2**; os derivados **29** e **30** seriam obtidos à partir dos correspondentes **31** e **32**. ii) Metodologia de síntese de Gabriel partindo-se dos di-haletos análogos **31** ( $\text{X}=\text{O}$ ), **32** ( $\text{X}=\text{NH}$ ), **33** ( $\text{X}=\text{S}$ ), **34** ( $\text{X}=\text{SO}_2$ ) tendo como intermediários as bis-ftalimidas **35** ( $\text{X}=\text{S}$ ), **36** ( $\text{X}=\text{SO}_2$ ), **37** ( $\text{X}=\text{O}$ ) e **38** ( $\text{X}=\text{NH}$ );

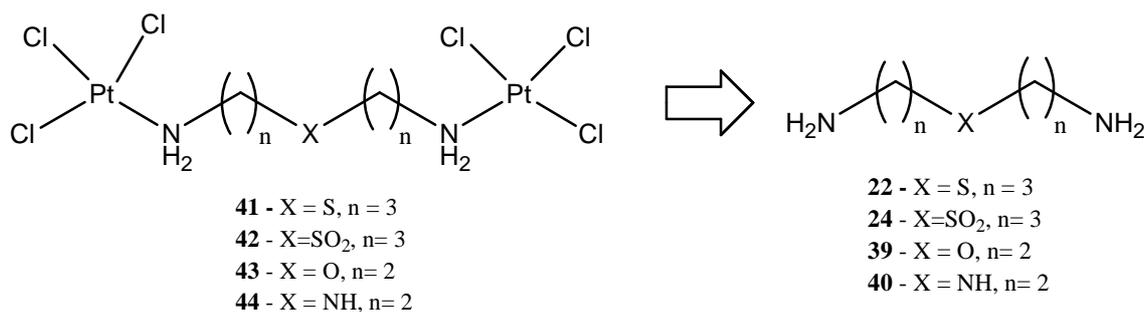


**Figura 19. Retrossíntese planejada para diaminas a partir de dinitrilas.**



**Figura 20. Retrossíntese para preparação de diaminas via síntese de Gabriel.**

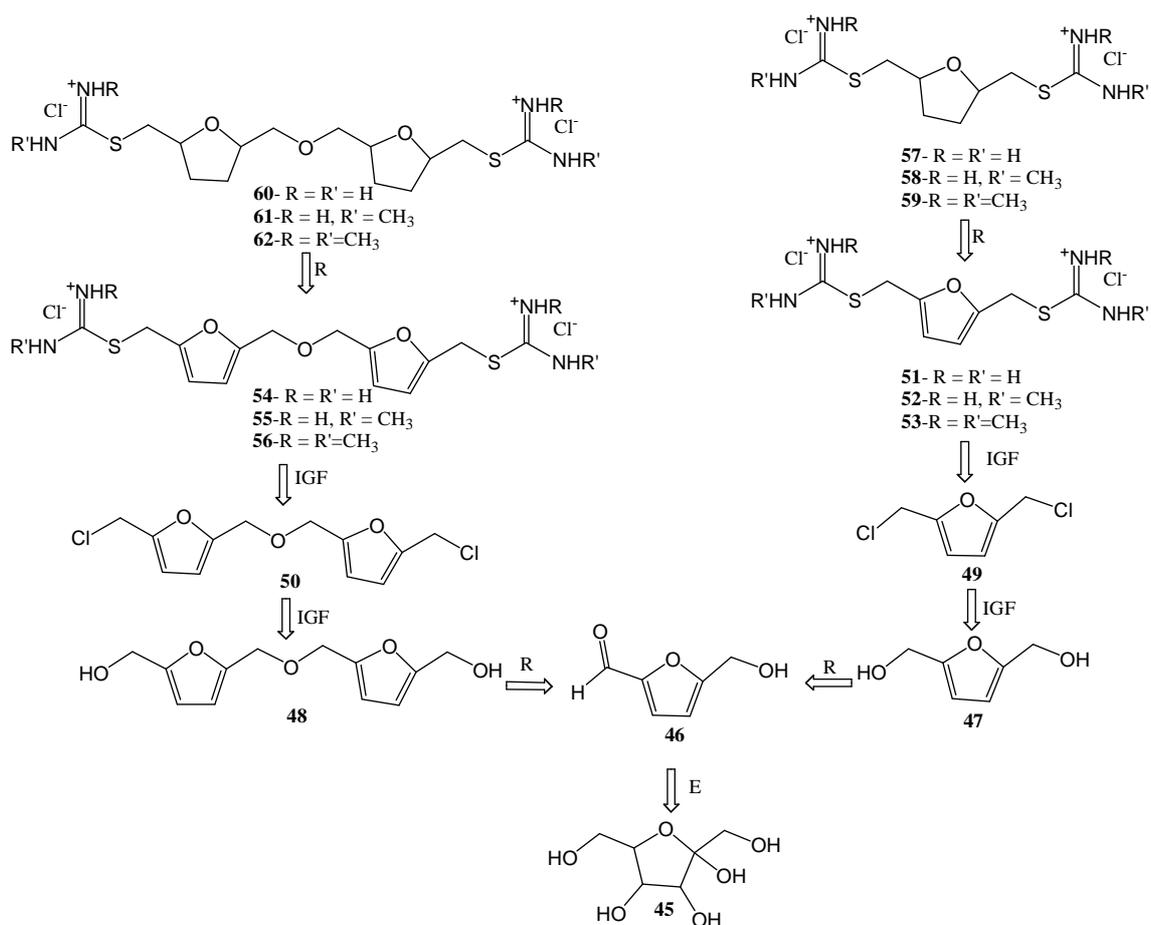
d) Preparação e caracterização de complexos de platina **41-44** (Figura 21 e 24) a partir das diaminas **21-26** preparadas como citado no item c;



**Figura 21. Retrossíntese dos complexos planejados.**

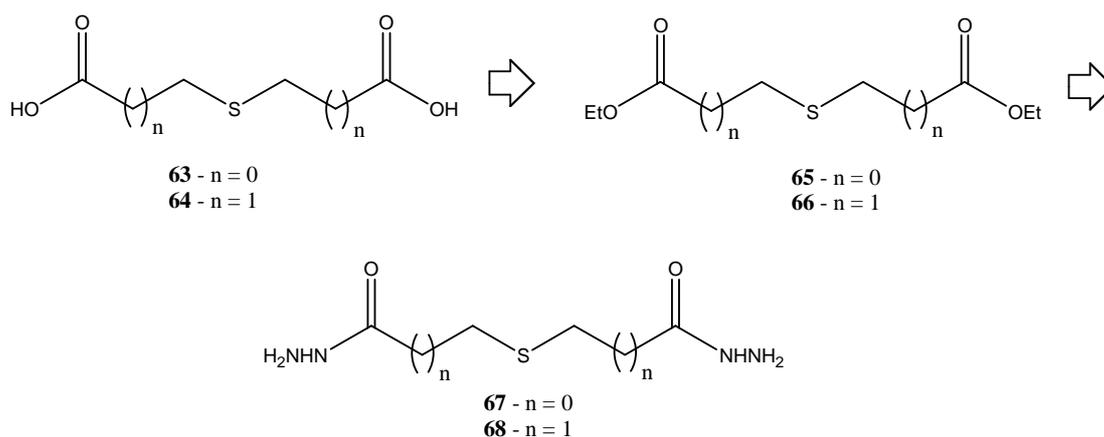
e) Síntese, isolamento e caracterização espectrométrica de derivados furânicos (Almeida, 2011) (**51-56**, Figura 22 e 24) – precursores dos tetra-hidrofuranos desejados - através de rota sintética partindo da frutose **45** e dos correspondentes derivados  $\alpha,\omega$ -di-hidroxilados e  $\alpha,\omega$ -diclorados correspondentes (**47-50**, Figura 22 e 24);

f) Síntese, isolamento e caracterização espectrométrica de novos derivados tetra-hidrofurânicos (**57-62**, Figura 22 e 24) pela hidrogenação dos derivados furânicos correspondentes **51-56** preparados conforme item anterior e;

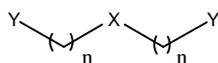


**Figura 22. Rota retróssintética de compostos furanos e tetra-hidrofuranos.**

g) Preparação e caracterização de hidrazidas **67-68** (Figura 23 e 24), à partir de derivados ésteres **65-66**, que foram obtidos à partir de ácidos carboxílicos **63-64**;



**Figura 23. Rota retróssintética de compostos hidroxilaminas.**



- 1- n=2, X=S, Y=CN  
 2- n=3, X=S, Y=CN  
 3- n=2, X=S, Y=Tetrazol  
 4- n=3, X=S, Y=Tetrazol  
 5- n=2, X=SO, Y=Tetrazol  
 6- n=3, X=SO, Y=Tetrazol  
 7- n=2, X=SO<sub>2</sub>, Y=Tetrazol  
 8- n=3, X=SO<sub>2</sub>, Y=Tetrazol  
 9- n=2, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH  
 10- n=2, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH  
 11- n=3, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH  
 12- n=3, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH  
 13- n=2, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl  
 14- n=2, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl  
 15- n=3, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl  
 16- n=3, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl  
 17- n=2, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Tioureia  
 18- n=2, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Tioureia  
 19- n=3, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Tioureia  
 20- n=3, X=S, Y=Tetrazol-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Tioureia  
 21- n=3, X=S, Y=NH<sub>2</sub>  
 22- n=4, X=S, Y=NH<sub>2</sub>

- 23- n=3, X=SO<sub>2</sub>, Y=NH<sub>2</sub>  
 24- n=4, X=SO<sub>2</sub>, Y=NH<sub>2</sub>  
 25- n=3, X=O, Y=NH<sub>2</sub>  
 26- n=3, X=NH, Y=NH<sub>2</sub>  
 27- n=2, X=SO<sub>2</sub>, Y=CN  
 28- n=3, X=SO<sub>2</sub>, Y=CN  
 29- n=2, X=O, Y=CN  
 30- n=2, X=NH, Y=CN  
 31- n=2, X=O, Y=Cl  
 32- n=2, X=NH, Y=Cl  
 33- n=3, X=S, Y=Cl  
 34- n=3, X=SO<sub>2</sub>, Y=Cl  
 35- n=3, X=S, Y=ftalimida  
 36- n=3, X=SO<sub>2</sub>, Y=ftalimida  
 37- n=2, X=O, Y=ftalimida  
 38- n=2, X=NH, Y=ftalimida  
 39- n=2, X=O, Y=NH<sub>2</sub>  
 40- n=2, X=NH, Y=NH<sub>2</sub>  
 41- n=3, X=S, Y=NH<sub>2</sub>PtCl<sub>3</sub>  
 42- n=3, X=SO<sub>2</sub>, Y=NH<sub>2</sub>PtCl<sub>3</sub>  
 43- n=2, X=O, Y=NH<sub>2</sub>PtCl<sub>3</sub>  
 44- n=2, X=NH, Y=NH<sub>2</sub>PtCl<sub>3</sub>

#### 45 - Frutose

#### 46-Hidroxifurfuraldeído

- 47- n=1, X=Furano, Y= OH  
 48- n=1, X=Furano-O-Furano, Y= OH  
 49- n=1, X=Furano, Y= Cl  
 50- n=1, X=Furano-O-Furano, Y= Cl  
 51- n=1, X=Furano, Y= Tioureia  
 52- n=1, X=Furano, Y=1-metil-2-tioureia  
 53- n=1, X=Furano, Y=1,3-dimetil-tioureia  
 54- n=1, X=Furano-O-Furano, Y= Tioureia  
 55- n=1, X=Furano-O-Furano, Y= 1-metil-2-tioureia  
 56- n=1, X=Furano-O-Furano, Y= 1,3-dimetil-tioureia  
 57- n=1, X=Tetrahydrofurano, Y= Tioureia  
 58- n=1, X=Tetrahydrofurano, Y=1-metil-2-tioureia  
 59- n=1, X=Tetrahydrofurano, Y=1,3-dimetil-tioureia  
 60- n=1, X=Tetrahydrofurano-O-Tetrahydrofurano, Y= Tioureia  
 61- n=1, X=Tetrahydrofurano-O-Tetrahydrofurano, Y= 1-metil-2-tioureia  
 62- n=1, X=Tetrahydrofurano-O-Tetrahydrofurano, Y= 1,3-dimetil-tioureia  
 63- n=1, X=S, Y=C(O)OH  
 64- n=2, X=S, Y=C(O)OH  
 65- n=1, X=S, Y=C(O)OEt  
 66- n=2, X=S, Y=C(O)OEt  
 67- n=1, X=S, Y=C(O)NHNH<sub>2</sub>  
 68- n=2, X=S, Y=C(O)NHNH<sub>2</sub>

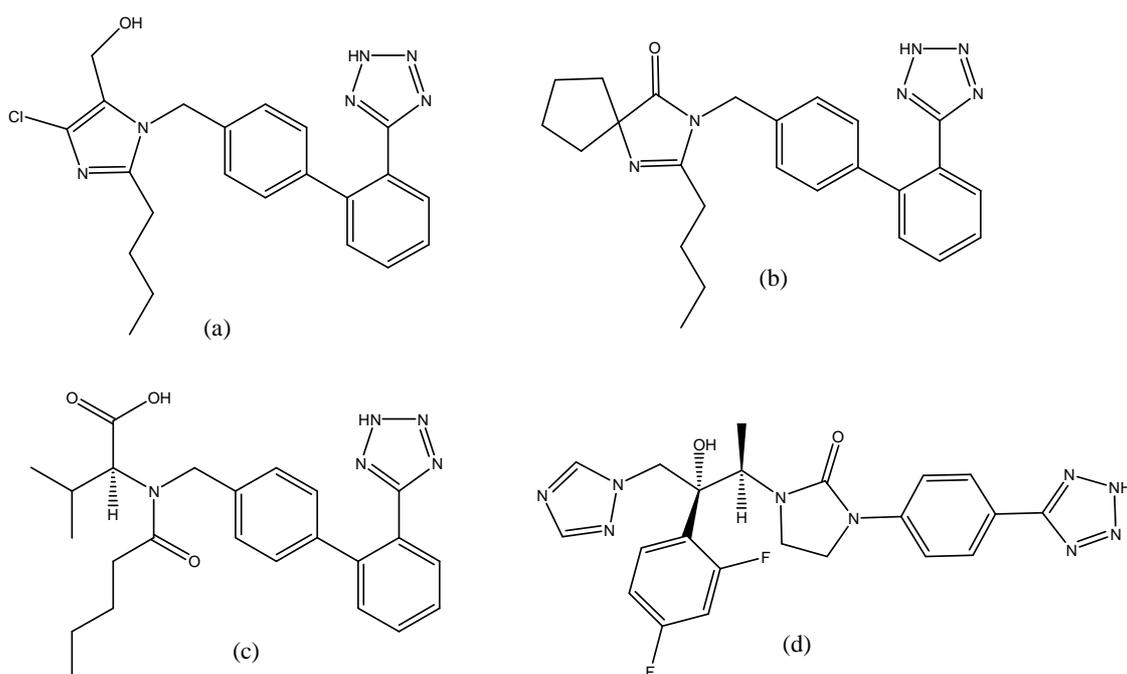
**Figura 24. Estruturas das substâncias propostas para estudo nesta tese, com excessão de 45 que é um precursor para síntese dos compostos furânicos e tetra-hidrofurânicos.**

- h) Estudo da atividade antifúngica "in vitro" (determinação de MIC) dos derivados sintetizados contra *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*), *Cryptococcus neoformans*, *C.gatti*, *Saccharomyces cerevisiae*; *Aspergillus spp.* (*A. clavatus*, *A. fumigatus* (clínico), *A. flavus*, *A. tamarii*), e *Paracoccidioides spp.* (isolados clinicamente MG05, PB01, 18, B339, 608, 1017, MG04) no laboratório de micologia (ICB) com colaboração da Profa. Ma. Aparecida Resende Stoianoff;
- i) Estudo de citotoxicidade dos compostos obtidos frente à linhagem de BHK feito no laboratório de Farmacologia (ICB) com a colaboração da Profa. Miriam Tereza Paz Lopes;
- j) Avaliação da atividade antineoplásica dos compostos preparados frente a linhagens 4T1 (M) (carcinoma mamário murino), A549 (carcinoma de pulmão humano), MEWO (melanoma humano), C6 (glioma de rato) feita no laboratório de Farmacologia (ICB) com a colaboração da Profa. Miriam Tereza Paz Lopes;
- k) Triagem e avaliação de atividade antibacteriana dos compostos contra *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa), *Escherichia coli* (Gram negativa), *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) e *Staphylococcus aureus* multirresistente (MARSA) (Gram positiva) efetuadas no laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (ICB), com a colaboração da Profa. Ma. Auxiliadora Roque de Carvalho.

### 3 - Resultados e Discussão

#### 3.1 – Obtenção de Bis-tetrazóis e COS

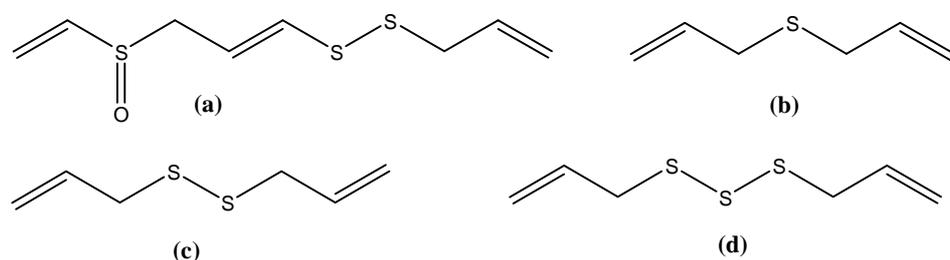
Azóis pertencem a uma classe de heterociclos com ampla atividade biológica conhecida, entre elas, antiviral, antibacteriana, antifúngica, antialérgica, anticonvulsiva e anti-inflamatória (Kumar *et al.*, 2011). Estudos recentes demonstraram o desenvolvimento de um tetrazol com grande potencial anticâncer (Kumar *et al.*, 2011). Além disso, é bastante difundido que moléculas pequenas apresentam grande potencial na medicina, pois podem se ligar ao DNA e, portanto, serem potenciais agentes anticancerígenos (Kumar *et al.*, 2011). Há importantes derivados tetrazólicos aprovados como medicamentos pela FDA (*Food and Drug Administration*). Entre tais se encontram os anti-hipertensivos losartan, irbesartan e valsartan e o agente antifúngico TAK-456 (**Figura 25**)(Kumar *et al.*, 2011).



**Figura 25. Medicamentos que apresentam anéis tetrazólicos: (a) losartan, (b) irbesartan, (c) valsartan e (d) TAK-456.**

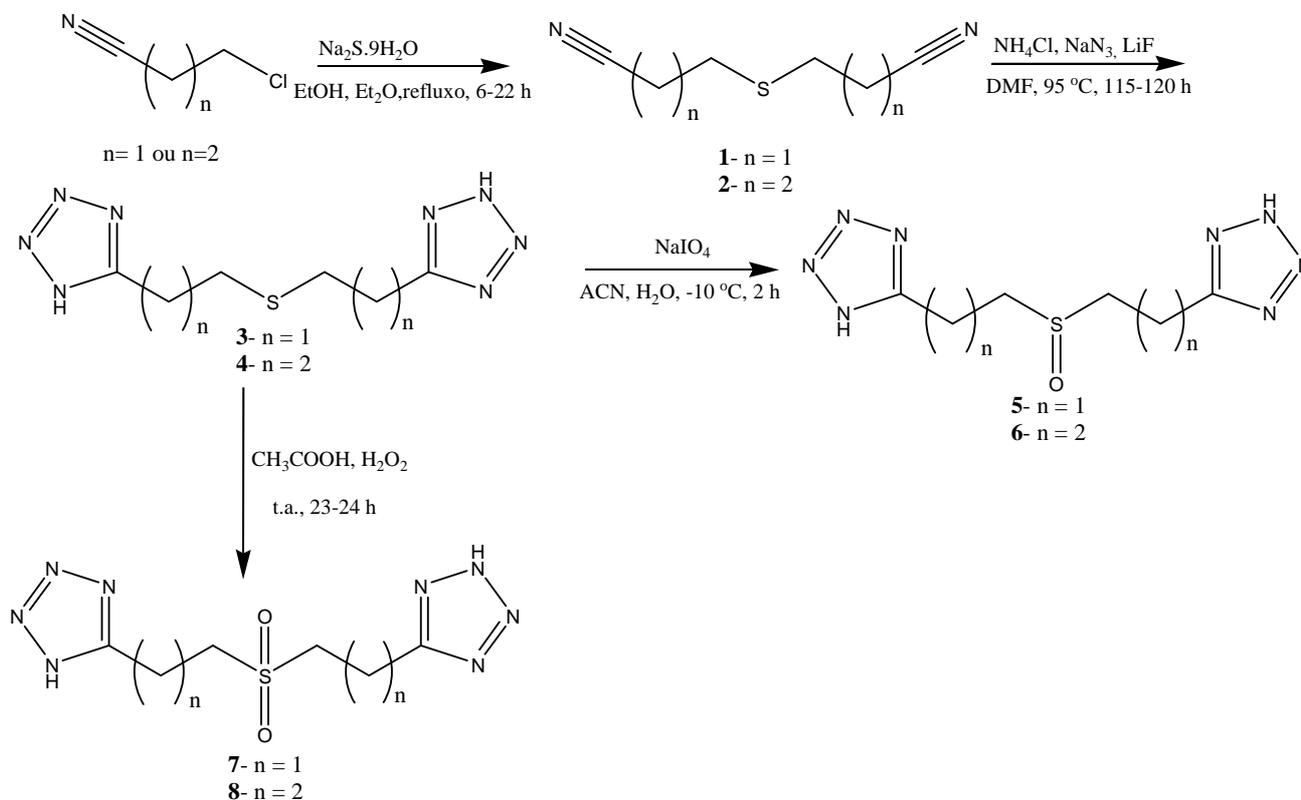
Além disso, como já mencionado, é bem difundida a ampla atividade farmacológica de compostos organossulfurados (Iciek *et al.*, 2009) como os derivados de alilsulfeto e outros compostos presentes no alho (O'Gara *et al.*, 2000; Tsao e Yin, 2001) (**Figura 26**). Assim, buscou-se sintetizar moléculas quiméricas (que podem ser moléculas formadas por dois grupos farmacofóricos diferentes), que pudessem apresentar os dois grupos farmacofóricos

(organossulfurado e tetrazol), visando um sinergismo de ação farmacológica e que fossem simétricas e pudessem ser obtidas por reações químicas clássicas, bem estabelecidas na literatura.



**Figura 26. Compostos organossulfurados presentes no alho com atividade biológica comprovada: (a) Ajoeno, (b) Dialil sulfeto (DAS), (c) Dialil dissulfeto (DADS), (d) Dialil trissulfeto (DATS).**

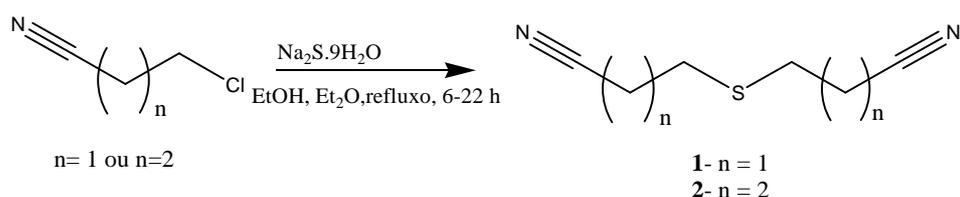
Com esta finalidade os compostos bis-tetrazólicos foram preparados segundo a rota sintética da **Figura 27**. A seguir será detalhada a discussão dos resultados obtidos.



**Figura 27. Rota sintética de bis-tetrazóis obtidos.**

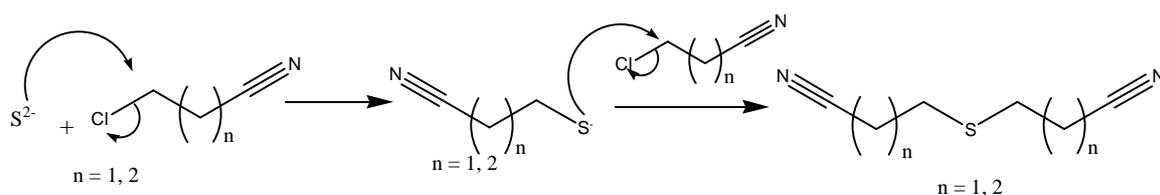
Dos produtos finais bis-tetrazólicos, apenas os derivados 1,5-bis-(5-tetrazolil)-3-tiapentano (**3**) e 1,5-bis-(5-tetrazolil)-3-dioxatiapentano (**7**) foram descritos na literatura, sendo os demais inéditos. Todos os espectros para caracterização destes compostos encontram-se no **Anexo II** desta tese.

### 3.1.1- Obtenção de 1,5-bis-(5-dinitril)-3-tiapentano (**1**) e 1,7-bis-(7-dinitril)-4-tiaheptano (**2**)



**Figura 28. Rota sintética de obtenção de dinitrilas 1 e 2.**

A primeira etapa de síntese dos bis-tetrazóis envolveu a preparação dos precursores dinitrila (**1** e **2**) que foram preparados em rendimentos de 77 a 93%, a partir da reação das halonitrilas correspondentes com sulfeto de sódio em etanol. O procedimento de preparação foi relatado na literatura por Nakrasov (Nakrasov, 1927), os tempos de refluxo foram de 6 h para preparação do precursor **1** e de 22 h para o precursor **2**; o mecanismo de reação que deve ocorrer é do tipo substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) que é bem estabelecido na literatura (**Figura 29**).

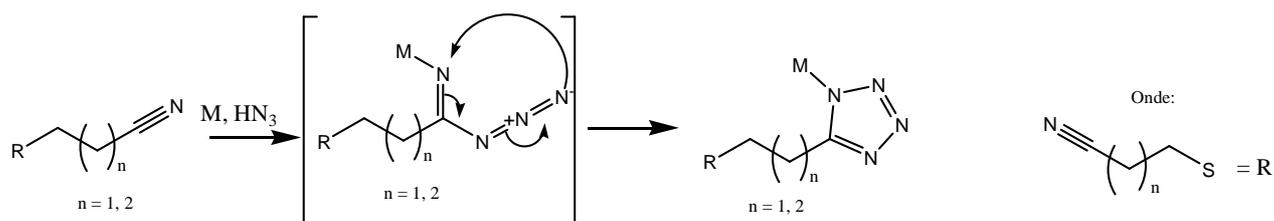


**Figura 29. Mecanismo geral de reação para preparação de derivados dinitrilas.**

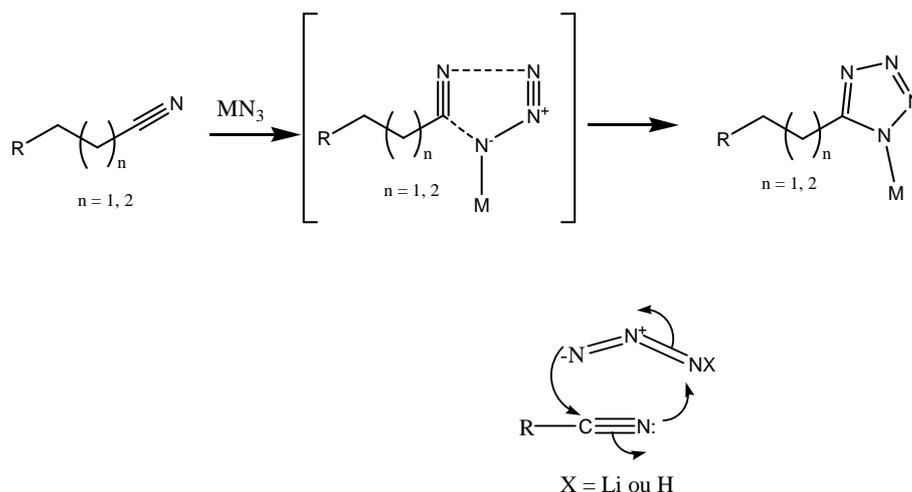
Como ambos os produtos são conhecidos na literatura, compararam-se os dados físico-químicos obtidos e fez-se uma caracterização completa por espectrometria na região do infravermelho e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (auxiliado pelo subespectro DEPT 135). Na **Tabela 2** encontram-se os dados de RMN e das principais bandas do espectro na região do infravermelho (espectros encontram-se no **Anexo II**, páginas V-VIII) dos produtos **1** e **2** que corroboram as estruturas propostas para ambos os produtos obtidos nesta etapa. Na **Tabela I**, página I do Anexo I encontram-se os dados de RMN para comparação dos deslocamentos químicos de RMN.



Mecanismo em duas Etapas



Mecanismo Concertado



**Figura 31. Mecanismo geral de preparação de derivados tetrazóis**

Com o intuito de evidenciar os sistemas conjugados envolvidos nestas reações de preparação de tetrazóis, podemos visualizar na **Figura 32** um esquema que mostra o 1,3-dipolo, o ácido hidrazóico (gerado *in situ* pela reação de azida de sódio com cloreto de amônio) que pode ser genericamente representado em uma sequência de três átomos *a-b-c*, em que na primeira extremidade, *a*, tem um sexteto de elétrons não estável, na segunda, *c* com um par de elétrons não-compartilhado. Este reagente sofrerá a reação de cicloadição para formação de tetrazol que pode ser classificada como cicloadição  $[4\pi_s + 2\pi_s]$  ou  $[4+2]$ , sendo que são quatro elétrons  $\pi$  do ácido hidrazóico e dois da nitrila, o dipolarófilo (**Figura 33**). Desta forma, este mecanismo denominado concertado, envolve orbital ocupado de mais alta energia (HOMO) da nitrila e o orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO) do ácido hidrazóico (**Figura 33**)(Carey e Sundberg, 2000; Smith e March, 2007).

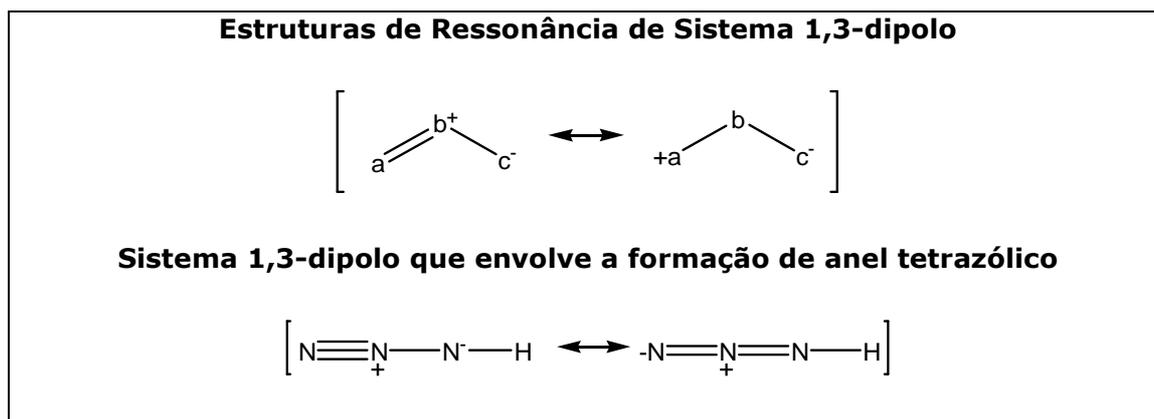


Figura 32. Sistema 1,3-dipolo para reações envolvendo formação de anel tetrazólico.

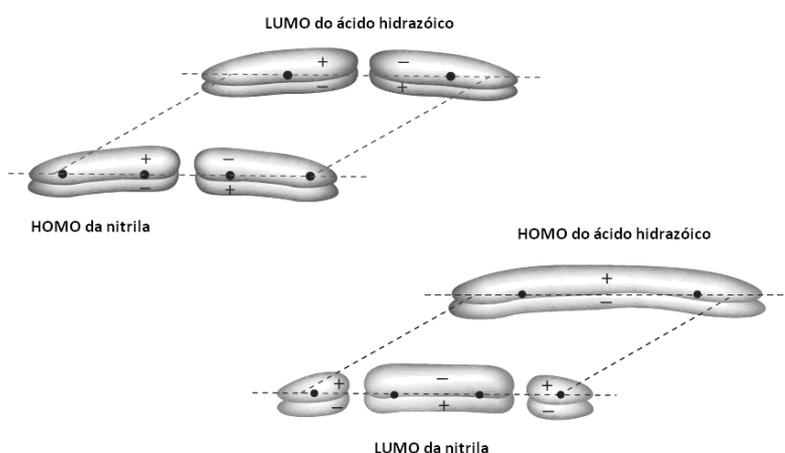


Figura 33. Duas maneiras de sobreposição de orbitais em uma cicloadição térmica [4+2] (Smith e March, 2007).

Segundo a metodologia relatada na literatura por Kumar (Kumar, 1987) para obtenção de **3** a reação foi realizada em DMF (dimetilformamida) à temperatura de refluxo, na presença de  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e  $\text{LiF}$ ; o produto era descrito como um óleo transparente teria sido purificado após separação cromatográfica em uma coluna em sílica. Cabe ressaltar que, embora neste artigo até tenha sido divulgado estudo da atividade anticancerígena de **3** e de outros derivados, não se conseguiu obter **3** em nenhuma das tentativas efetuadas com diversas modificações, entre elas: variação da razão molar dos reagentes (de 2 a 3 mol/mol), variação da temperatura da mistura reacional, extração do produto com solventes, outras alterações na etapa de elaboração como variação da concentração e do tipo de ácido usado etc. Desta forma, após a muitas tentativas, decidiu-se avaliar melhor esta preparação pela realização de outra metodologia reacional, como por exemplo, a descrita por Pedrosa (Pedrosa, 2003). Tal metodologia apresenta alguns procedimentos semelhantes aos descritos por Kumar (inclusive de extração), mas com ausência de fluoreto de lítio, uso de temperaturas mais suaves (90 - 95

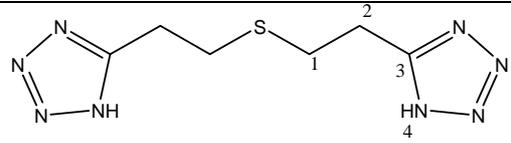
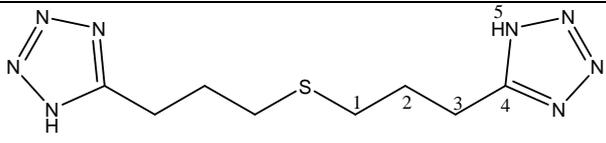
<sup>0</sup>C) e aumento do tempo de reação; todavia, mesmo com diversas alterações das condições reacionais e dos procedimentos de tratamento da mistura reacional, o produto também não foi obtido por este método. Em um relato de Satzinger (Satzinger, 1960), observou-se que: o estado físico destes derivados tetrazólicos análogos não era líquido, mas sólido (o que seria esperado para compostos tão polares como os planejados); a metodologia de tratamento da mistura reacional descrevia, além do uso de NaN<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub>Cl em DMF a refluxo mas com ausência de LiF, o uso de evaporação de DMF, adição de água e de hidróxido de sódio, extração com éter etílico e cristalização do produto com adição de solução de HCl 20 %. De fato, com esta metodologia obteve-se o produto esperado, mas com rendimento menor que 20 %. Com este último resultado, mais promissor, decidiu-se utilizar, de novo, a metodologia descrita por Satzinger (Satzinger, 1960), mas com as seguintes alterações: adição de LiF, uso de menor temperatura (90-95 <sup>0</sup>C) para evitar a volatilização de NH<sub>4</sub>Cl, precipitação do produto mediante adição de ácido (sem a necessidade da extração com éter ou uso de NaOH); porém obteve-se o produto desejado ainda não purificado pela presença da dinitrila de partida. Finalmente, a obtenção do produto **3** puro (como um sólido cristalino) somente foi conseguida, após a retirada de DMF por evaporação à pressão reduzida, adição de água, extração com clorofórmio (que retira a dinitrila de partida e facilita a precipitação do produto) e acidificação. Assim, com este produto em mãos, as análises de espectrometria na região do infravermelho, RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C, subespectro de DEPT e espectrometria de massas por *eletrospray* (baixa e alta resolução) e análise elementar, comprovaram definitivamente a obtenção do bis-tetrazol desejado **3** (com rendimentos de 63-70%).

Com a obtenção bem-sucedida de **3**, através da última metodologia citada, realizou-se igualmente a preparação de **4**, que foi completamente caracterizado por espectrometria na região do infravermelho, RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C (auxiliado pelo subespectro DEPT 135) e espectrometria de massas por ionização por *eletrospray* (ESI-MS). Na **Tabela 3** encontram-se os principais dados obtidos na caracterização destes compostos, além disso, na **Tabela I** do **Anexo I** (página I) encontram-se os valores de deslocamento químico para comparação com os demais compostos desta série (espectros de ambos os produtos encontram-se no **Anexo II**, páginas IX-XVI).

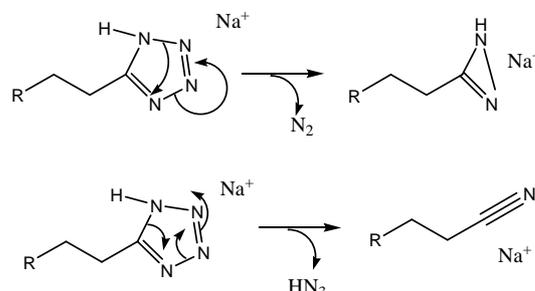
Os espectros na região do infravermelho mostraram algumas bandas comuns para os grupos funcionais presentes em ambas as estruturas, entre elas, aquela referente ao estiramento de ligação C=N em 1544 cm<sup>-1</sup> que é característica de compostos heterocíclicos tetrazólicos. Quanto aos espectros de RMN, estes mostraram os picos com valores de deslocamento químico ( $\delta$ ) condizentes às estruturas esperadas. Para completa caracterização do composto **4** realizou-se também o experimento RMN HMQC (**Anexo II**, página XIV), atribuindo os picos conforme **Tabela 3**. A confirmação da formação do sistema bis-tetrazólico

foi corroborada pela análise dos íons moleculares  $[M+Na]^+$  e pela fragmentação observada nos espectros de massas (ESI-MS); a fragmentação dos íons apresentaram o mesmo padrão de fragmentação, mostrando a quebra do anel tetrazólico, é digno de nota que simulações em programa computacional específico realmente indicam que, para os compostos sulfetos, a quebra no anel tetrazólico é energeticamente favorecida (Oliveira *et al.*, 2012). Os resultados da caracterização destes e dos demais compostos bis-tetrazólicos foram relatados em artigo específico da área pela autora desta tese (Oliveira *et al.*, 2012). O mecanismo proposto para esta fragmentação encontra-se na **Figura 34**.

**Tabela 3. Dados de espectros de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  e de espectro na região do infravermelho dos produtos (3) e (4).**

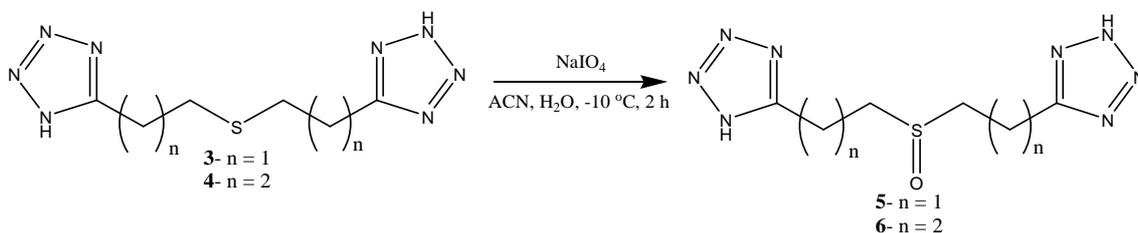
| Produto             |                          |                    |   |
|---------------------|--------------------------|---|---|
| Análise             |                          | <b>(3)</b><br><b>1,5-bis(tetrazolil)-3-tiapentano</b>   | <b>(4)</b><br><b>1,7-bis(7-tetrazolil)-4-tiaheptano</b>   |
| DMSO-<br>$d_6$      | RMN $^1H$<br>$\delta$    | 2,92 (H1, t, $J^{1,2} = 7, 4H$ ); 3,17 (H2, t, $J^{1,2} = 7, 4H$ )                                  | 1,93 (H2, qt, $J^{1,2} = 7, 4H$ ); 2,55 (H1, t, $J^{1,2} = 7, 4H$ )<br>2,95 (H3, t, $J^{2,3} = 7, 4H$ )   |
|                     | RMN $^{13}C$<br>$\delta$ | 23,6 (C1); 28,3 (C2); 154,8 (C3)  | 21,9 (C3); 27,0 (C2); 30,1 (C1); 155,7 (C4)   |
| IV ( $cm^{-1}$ )    |                          | 3353 (v N-H), 1639, 1544 (v C=N)  | 3193(v N-H), 2947(v C-H), 1641, 1544(v C=N)   |
| ESI-MS ( $m/z$ )    |                          | 227 $[M+H]^+$ , 249 $[M+Na]^+$ e 475 $[M+M+Na]^+$   | 255 $[M+H]^+$ , 277 $[M+Na]^+$  |
| ESI-MS-MS ( $m/z$ ) |                          | 227 $[M+H]^+$ , 129 $[M+H-CHCH_2Tz]^+$<br>249 $[M+Na]^+$ , 221 $[M+Na-N_2]^+$ , 206 $[M+Na-HN_3]^+$ | 255 $[M+H]^+$ , 185 $[M+H-Tz]^+$ , 111 $[M+H-SCH_2CH_2Tz]^+$<br>277 $[M+Na]^+$ , 249 $[M+Na-N_2]^+$ , 234 $[M+Na-HN_3]^+$ , 191 $[M+Na-2HN_3]^+$ , 133 $[M+Na-SCH_2CH_2CH_2Tz]^+$ |

\*\*\*Tz: anel tetrazólico; t=tripleto; qt=quinteto



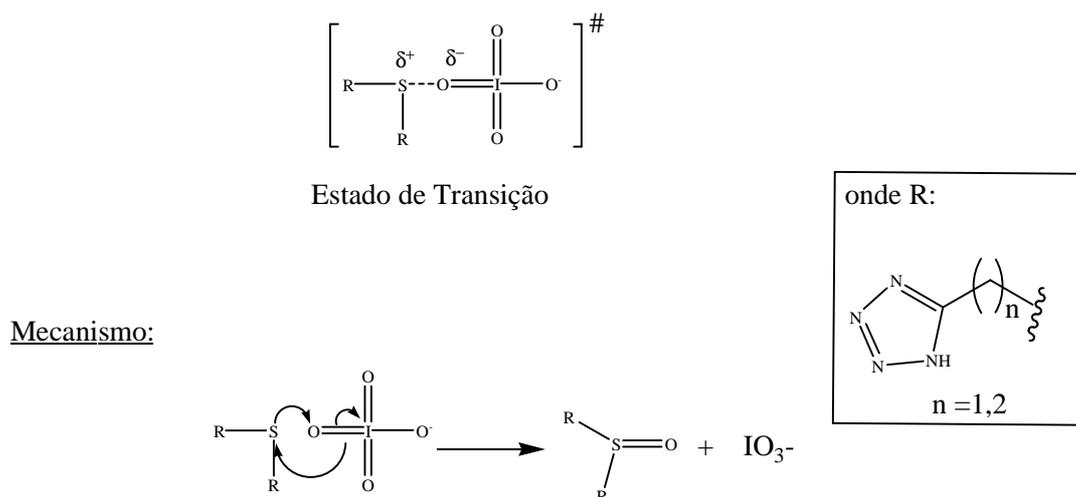
**Figura 34. Mecanismo geral de fragmentação do anel tetrazólico, proposto para as fragmentações do adulto  $[M+Na]^+$  de 3.**

### 3.1.3- Obtenção de 1,5-bis-(5-tetrazolil)-3-oxatiapentano (**5**) e 1,7-bis-(7-tetrazolil)-4-oxatia-heptano (**6**)



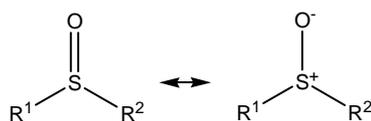
**Figura 35. Rota sintética de obtenção de sulfóxidos bis-tetrazóis 5 e 6.**

Os sulfóxidos **5** e **6** foram obtidos (60-70 %) a partir da reação de oxidação seletiva dos sulfetos correspondentes com periodato de sódio, em água e acetonitrila, à temperaturas entre -5 a 0 °C. Estudos cinéticos sugerem que no mecanismo desta reação envolve o ataque do enxofre ao oxigênio do periodato (**Figura 36**) (Ruff e Kucsmann, 1985; Ferenc *et al.*, 2009).



**Figura 36. Mecanismo geral da reação para obtenção de sulfóxidos a partir da oxidação de sulfetos com periodato.**

Além do mais, os sulfóxidos são bases de Lewis (Darwish e Tomilson, 1968) e realizam ligações  $\pi$  originadas da sobreposição de orbitais 2p do oxigênio com orbitais 3d do enxofre, tal sobreposição explica a fraca interação S-O que favorece a basicidade (**Figura 37**) e faz com que a hibridização do átomo de enxofre seja  $sp^3$  gerando um centro assimétrico que transforma os grupos metilênicos vizinhos em grupos diastereotópicos aumentando a multiplicidade dos sinais em RMN  $^1\text{H}$ .

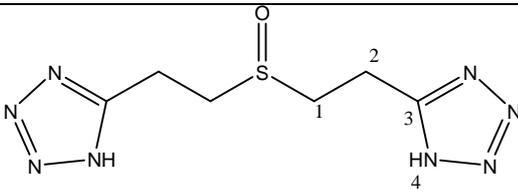
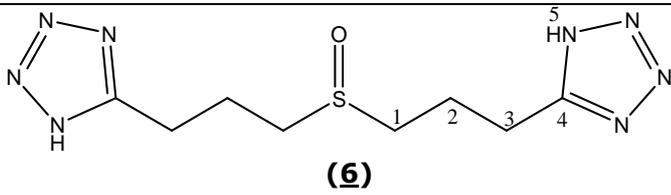


**Figura 37. Estruturas de ressonância de um sulfóxido.**

A primeira confirmação da obtenção bem-sucedida do sulfóxido, para ambos os produtos **5** e **6**, foi a observação da banda característica de  $\nu_{S=O}$  em  $1050\text{ cm}^{-1}$ . Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do produto **5** (**Anexo II**, página XVII) não foi possível a atribuição segura dos sinais de ressonância, pois, os hidrogênios metilênicos são apresentados como multipletos:  $\delta$  2,62, 2,56, 2,52, e 2,48 ppm devido ao fato, já mencionado, que os sulfóxidos causam desdobramento de sinais vizinhos. Assim, foi feita a simulação do RMN  $^1\text{H}$  desta estrutura no programa *Chem Draw* e os cálculos teóricos de deslocamento químico para H-1 e H-2 da estrutura mostram que realmente os valores de deslocamento químico dos hidrogênios de **5** devem estar muito próximos, respectivamente,  $\delta$  2,90 ppm e  $\delta$  2,89 ppm (**Anexo II**, página XVII). No entanto, para melhor atribuição dos sinais observados nos espectros de RMN de **6** (**Tabela 4**, página 49) foi necessário realizar o experimento HMQC (**Anexo II – Figura XXXIV**, página XXI).

O espectro de massas ESI-MS mostrou os picos referentes ao íon molecular de **5** como  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  ( $m/z$  265),  $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^+$  ( $m/z$  247, formado segundo **Figura 38**). A fragmentação de  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  formou o íon de fragmentação  $m/z$  169, originário de maneira análoga à ilustrada na **Figura 38** (página 49) o que confirmou a obtenção do composto com a estrutura de **5**. O espectro ESI-MS de **6** apresenta padrão de fragmentação análogo ao do produto **5**, ou seja, o íon com maior intensidade relativa (**Anexo II – Figura XXXVI**, página XXII) é formado de maneira análoga à mostrada na **Figura 39** (página 50), cabe ressaltar que os produtos gerados desta fragmentação não são energeticamente favorecidos. Uma hipótese para o favorecimento deste produto é a que o estado de transição para o produto de fragmentação tenha menor energia quando comparado ao estado de transição da quebra do anel tetrazólico (**Figura 34**, página 36) (Oliveira *et al.*, 2012).

Tabela 4. Dados de espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e de espectro na região do infravermelho dos produtos 5 e 6

| Produto                |                          |   |   |
|------------------------|--------------------------|--|---|
| Análise                |                          | (5)<br>1,5-bis-(5-tetrazolil)-3-oxatia-pentano   | (6)<br>1,7-bis-(7-tetrazolil)-4-oxatia-heptano  |
| (D <sub>2</sub> O)     | RMN <sup>1</sup> H<br>δ  | 2,62-2,48 (H1 e H2, m)   | 2,05 (H2, qt, J <sup>1,2</sup> = 7, 4H); 2,78 (H3, t, J <sup>1,2</sup> = 7, 4H); 2,98 (H1, t, J <sup>2,3</sup> = 7, 4H)   |
|                        | RMN <sup>13</sup> C<br>δ | 47,7 (C1); 16,9 (C2); 154,5(C3)  | 19,9 (C2); 21,4 (C1); 49,3 (C3); 155,5(C4)  |
| IV (cm <sup>-1</sup> ) |                          | 1630 cm <sup>-1</sup> (v C=N para heterocíclicos), 1065-1045 cm <sup>-1</sup> (v S=O de sulfóxido) e a 719 cm <sup>-1</sup> (v C-S). | 1632 cm <sup>-1</sup> (v C=N para heterocíclicos), 1053-1000 cm <sup>-1</sup> v S=O de sulfóxido) e 722 cm <sup>-1</sup> (v C-S).   |
| ESI-MS (m/z)           |                          | 265 [M+Na] <sup>+</sup> , 247 [M+Na-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>   | 293 [M+Na] <sup>+</sup>   |
| ESI-MS-MS (m/z)        |                          | 265 [M+Na] <sup>+</sup> , 169 [M-CHCH <sub>2</sub> Tz] <sup>+</sup>  | 293 [M+Na] <sup>+</sup> , 237 [M+Na-2N <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , 207 [M+Na-2HN <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> , 183 [M+Na-CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Tz] <sup>+</sup> |

\*\*\*Tz: anel tetrazólico; t=tripleto; qt=quinteto

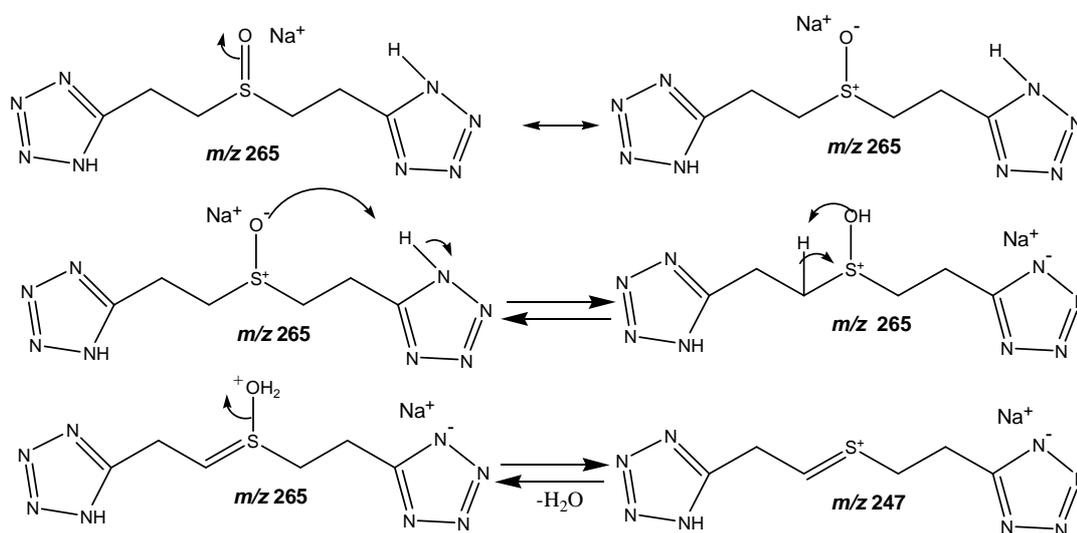


Figura 38. ESI: Íons moleculares [M+Na]<sup>+</sup> m/z 269 e [M-H<sub>2</sub>O+Na]<sup>+</sup> m/z 247 para o composto 5.

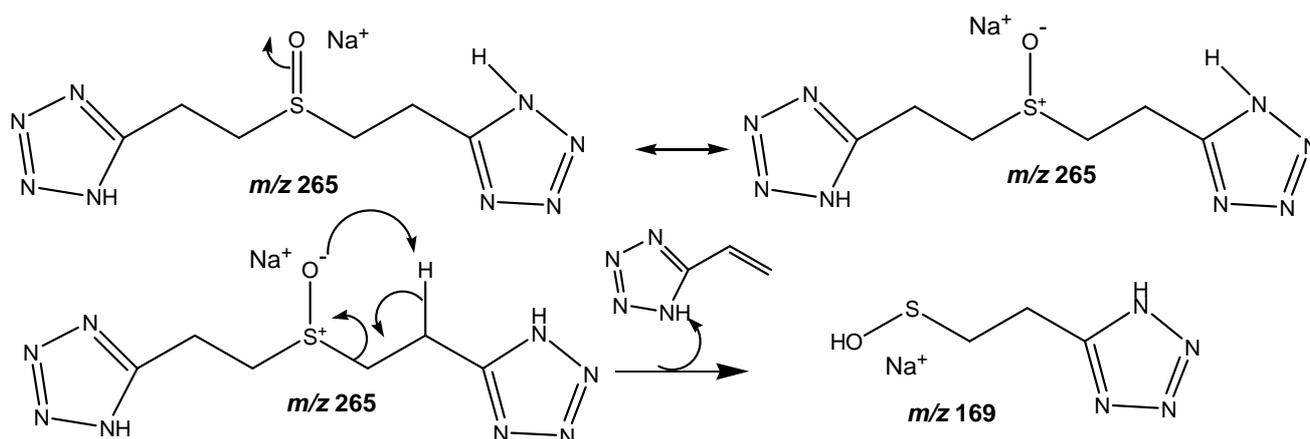


Figura 39. Formação do íon  $m/z$  169 originado à partir da fragmentação de  $m/z$  265.

### 3.1.4- Obtenção de 1,5-bis(tetrazolil)-3-bisoxatipentano (7) e 1,7-bis(tetrazolil)-4-bisoxatiaheptano(8)

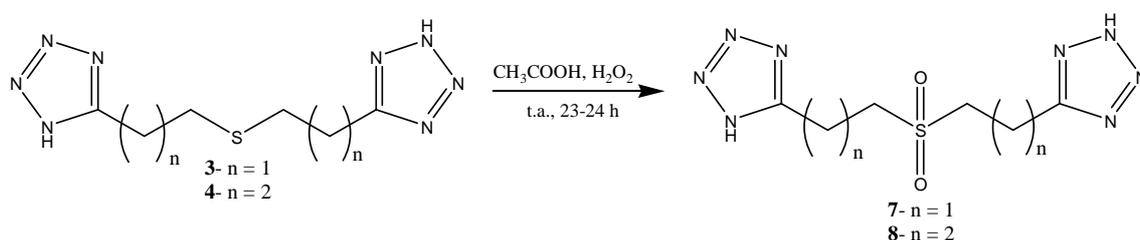


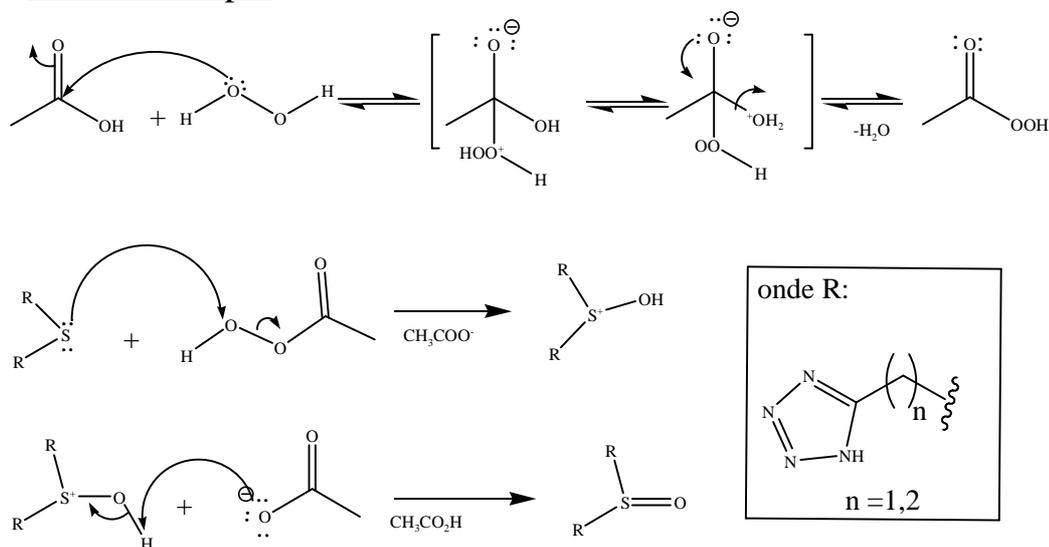
Figura 40. Rota sintética de obtenção de sulfonas bis-tetrazóis **7** e **8**.

As sulfonas **7** e **8** (Figura 40) foram obtidas, com rendimentos em torno de 62-70 %, a partir da reação de oxidação completa dos sulfetos correspondentes com peróxido de hidrogênio (30 %) em ácido acético glacial, à temperatura ambiente, por 24 h; o mecanismo está descrito na Figura 41 e discutido a seguir.

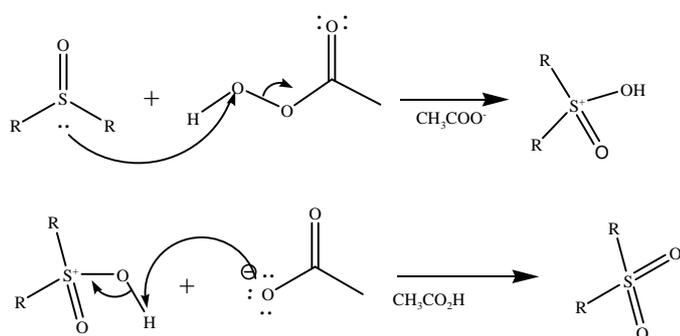
O mecanismo de oxidação é parcialmente fornecido na literatura (Shaabani e Rezayan, 2007; Smith e March, 2007) e encontra-se proposto na Figura 41. A primeira etapa de oxidação ocorre rapidamente a partir da formação do ácido peracético que, em uma etapa seguinte, reage com o sulfeto. Inicialmente, o sulfeto age como um nucleófilo atacando o ácido percarboxílico formando-se o cátion hidroxissulfônio que é rapidamente convertido ao sulfóxido. A segunda etapa é mais lenta e ocorre com tendo o enxofre do sulfóxido formado na primeira

etapa como nucleófilo, agindo sobre o ácido peracético, com a saída de acetato e desprotonação, ocorre a formação da sulfona desejada.

Primeira Etapa:



Segunda Etapa:

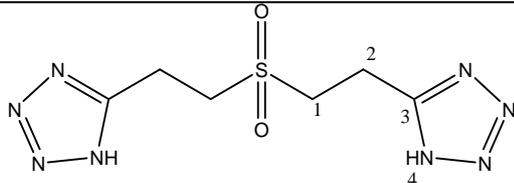
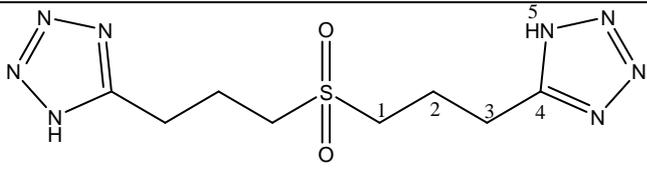


**Figura 41. Mecanismo geral proposto de oxidação de sulfeto a sulfona na presença de peróxido de hidrogênio e ácido acético glacial.**

O produto **7**, inédito na literatura, apresentou-se como um sólido branco, com ponto de fusão na faixa de 252-254 °C. Os dois produtos sulfônicos obtidos foram caracterizados pelas mesmas técnicas mencionadas anteriormente e os dados se encontram na **Tabela 5**. Destacase a caracterização pela espectrometria na região do infravermelho (**Anexo II**, páginas XXIII e XXVI) que inicialmente confirmou obtenção do grupo sulfona, para **7** e **8**, pela presença característica de bandas intensas relacionadas às vibrações de estiramento simétrico ( $\nu_{SO_2} = 1137$  e  $1118\text{ cm}^{-1}$ ) e não-simétrico ( $\nu_{SO_2} = 1328$  e  $1335\text{ cm}^{-1}$ ) deste grupo funcional. Os dados

de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (**Anexo II**, páginas XXIII-XXIV e XXVI-XXVII) confirmaram a obtenção das sulfonas sem a contaminação dos sulfóxidos correspondentes, pois os deslocamentos químicos foram alterados para valores maiores e sem a multiplicidade maior geralmente observada para sulfóxidos. Além do mais, a análise dos valores de deslocamentos químicos e, no caso do RMN  $^1\text{H}$ , das integrais relativas confirmam a obtenção de um composto sulfona bis-tetrazólico, como esperado (**Tabela 5**).

**Tabela 5. Dados de espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e de IV de 7 e 8**

| Produto                 |                                 |   |    |
|-------------------------|---------------------------------|--|--|
| Análise                 |                                 | <b>(7)</b><br><b>1,5-bis-(5-tetrazolil)-3-bisoxatipentano</b>  | <b>(8)</b><br><b>1,7-bis-(7-tetrazolil)-4-bisoxatiaheptano</b>   |
| (DMSO)                  | RMN $^1\text{H}$<br>$\delta$    | 3,37 ( <b>H2</b> , $J^{1,2} = 7$ , 4H), 3,70 ( <b>H1</b> , $J^{1,2} = 7$ , 4H)   | 2,14 ( <b>H2</b> , <i>qt</i> , $J^{1,2} = 7,7$ , 4H); 3,04 ( <b>H3</b> , <i>t</i> , $J^{1,2} = 7$ , 4H)<br>3,24 ( <b>H1</b> , <i>t</i> , $J^{2,3} = 7$ , 4H) |
|                         | RMN $^{13}\text{C}$<br>$\delta$ | 16,5 ( <b>C2</b> ); 49,3 ( <b>C1</b> ); 153,9 ( <b>C3</b> )  | 19,5 ( <b>C2</b> ); 21,5 ( <b>C3</b> ); 50,7 ( <b>C1</b> ); 155,1 ( <b>C4</b> )  |
| IV ( $\text{cm}^{-1}$ ) |                                 | 1547 $\text{cm}^{-1}$ (v C=N para heterocíclicos), 1328 e 1066 $\text{cm}^{-1}$ (v $\text{SO}_2$ de sulfona) e a 765 $\text{cm}^{-1}$ (v C-S). | 1561 $\text{cm}^{-1}$ (v C=N para heterocíclicos), 1118 e 1335 $\text{cm}^{-1}$ (v $\text{SO}_2$ de sulfona) e 751 $\text{cm}^{-1}$ (v C-S).                 |
| ESI-MS ( $m/z$ )        |                                 | 259 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 281 $[\text{M}+\text{Na}]^+$  | 287 $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 309 $[\text{M}+\text{Na}]^+$   |
| ESI-MS-MS ( $m/z$ )     |                                 | 281 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 253 $[\text{M}+\text{Na}-\text{N}_2]^+$ , 185 $[\text{M}-\text{CHCH}_2\text{Tz}]^+$                             | 309 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 281 $[\text{M}+\text{Na}-\text{N}_2]^+$ , 253 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{N}_2]^+$ ,  |

\*\*\*Tz: anel tetrazólico; *t*=tripleto; *qt*=quinteto

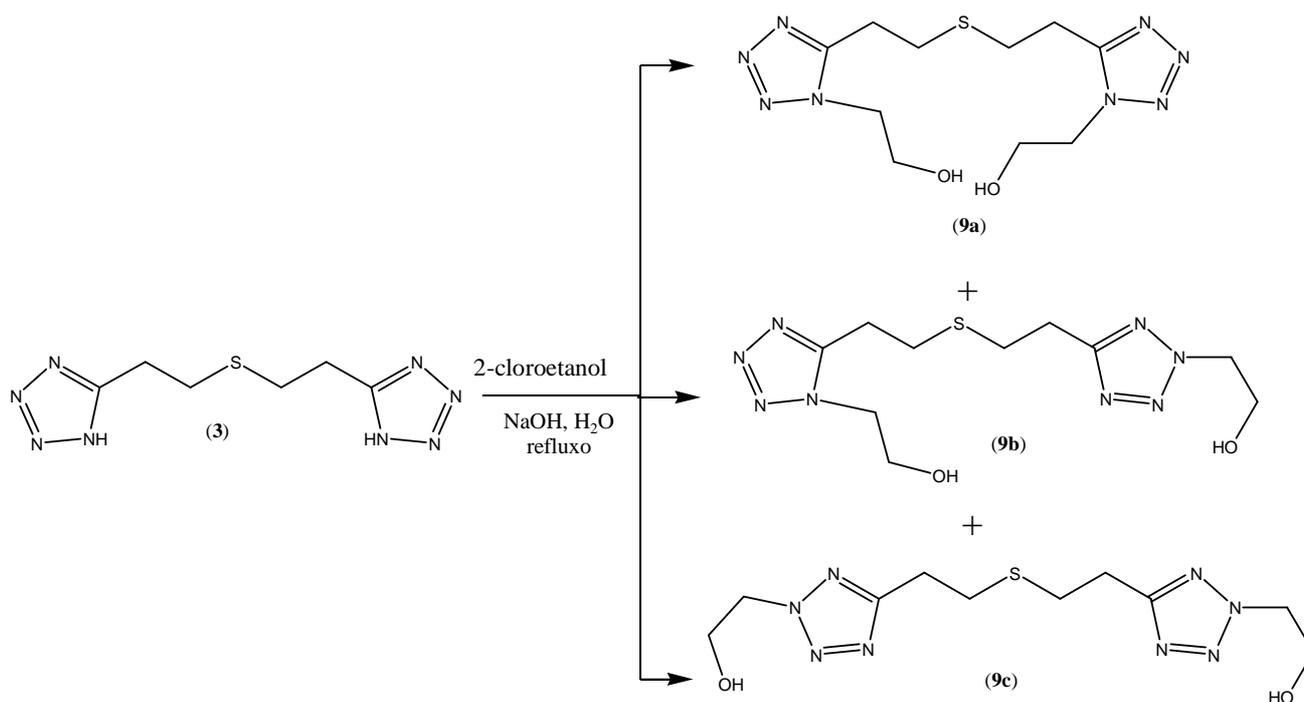
Cabe aqui discutir que, geralmente, na análise dos dados espectrométricos dos compostos tetrazólicos investigados, não houve problemas de atribuição dos dados para confirmação estrutural. Por exemplo, na análise dos dados de espectros de RMN  $^1\text{H}$  (**Tabela I - Anexo I**), observa-se pelo valor crescente de  $\delta$  (ppm), que os efeitos elétron-atraentes comparativos entre os grupos sulfanil, sulfinil e sulfonil ocorrem como esperado; contudo avaliando-se os dados de  $\delta$  (ppm) obtidos pelos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Tabela I - Anexo I**) não há esta linearidade, ou seja, ocorre um outro efeito, além do elétron-atraente atuando na blindagem dos átomos envolvidos. Pode-se sugerir, como já citado, que como o grupo sulfóxido apresenta maior basicidade do que a esperada, podendo acontecer uma ligação de hidrogênio intramolecular com o hidrogênio **H5** do anel tetrazólico, o que pode alterar a simetria do

sistema e os efeitos anisotrópicos ao redor, variando, de forma inesperada os valores de  $\delta$  (ppm) para RMN  $^{13}\text{C}$ .

### 3.2 – $\omega$ -Halo- $\alpha$ -alquilação de bis-tetrazóis: Tentativas de obtenção

Com o objetivo de se obter compostos que tivessem possível efeito sinérgico foram planejados novos análogos tetrazólicos substituídos com o grupo funcional S-tioureido (**17-20**) que seriam sintetizados conforme análise retrossintética apresentada anteriormente (**Figura 18**). Para preparação destes, realizou-se uma etapa de alquilação, em meio aquoso, dos derivados sulfetos **3** e **4** na presença, respectivamente, de 1-cloro-2-etanol (para obtenção de **9** e **11**) ou 1-cloro-3-propanol (para **10** e **12**). Após a reação e remoção do solvente à pressão reduzida a mistura reacional foi submetida à coluna cromatográfica em silicagel, obtendo-se um líquido levemente amarelado que quando submetido a análise cromatográfica por cromatografia por camada delgada (CCD) mostrou apenas uma mancha.

Os espectros na região do infravermelho (**Figura LI – Anexo II**, página XXX) confirmaram a introdução de unidades metileno-hidroxilicas pelo aparecimento das bandas em torno de  $3300\text{ cm}^{-1}$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$ , características de estiramento O-H e deformação C-O, respectivamente. A análise deste produto por ESI-MS (**Anexo II – Figura LVI**, página XXXIV) mostrou apenas os picos de íon molecular referentes aos adutos entre o produto dialquilado  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e/ou  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ou seja ter-se-ia obtido apenas um produto dialquilado. Contudo, a análise dos dados obtidos de espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  mostrou um perfil não-condisente a obtenção de um composto puro. A literatura científica indica que, nestes casos, obtêm-se uma mistura de três isômeros cuja separação não pode ser conseguida (Finnegan e Henry, 1962; Chafin *et al.*, 2008). Na verdade, este resultado, a princípio insatisfatório, pôde ser explicado por trabalhos descritos na literatura que relatam que a dificuldade de síntese destes compostos se encontrava na separação dos possíveis isômeros obtidos de alquilação não-seletiva (**Figura 42**).



**Figura 42. Rota sintética de obtenção de bis-tetrazóis dialquilados preparados: uma exemplificação dos isômeros obtidos para o produto 9.**

A presença de diferentes isômeros foi constatada pela análise detalhada dos resultados dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, que mostram o número de sinais maior do que o esperado, como por exemplo: no espectro de RMN <sup>1</sup>H de **9** (Figura LII – Anexo II, página XXXI) somente os sinais referentes aos hidrogênios **H1** (1,8-2,0 ppm; vizinhos ao átomos de S) e **H4** (4,3-4,7 ppm; vizinhos ao grupo OH) que são, respectivamente, os mais blindados e desblindados, podem ser atribuídos com menos incerteza, todos os demais sinais aparecem acumulados na região entre 2,4 e 3,9 ppm dificultando muitíssimo a atribuição. Cabe ressaltar que nem mesmo a literatura já citada realiza a atribuição dos sinais (Chafin *et al.*, 2008). Como é possível observar na Figura 42, dos três isômeros possíveis, dois deles são simétricos: **9a** (dialquilada nos Na) e **9c** (dialquilada nos Nβ); o derivado **9b** não é simétrico, por ser alquilado nos Na e Nβ. Assim, os sinais nos espectros de RMN <sup>13</sup>C serão tanto mais desdobrados quanto mais próximos estiverem dos átomos de N alquilados: i) dois sinais dos carbonos tetrazólicos (155 ppm e 165 ppm) se referem aos três possíveis isômeros, pois só é possível a diferenciação entre uma alquilação Na e Nβ; ii) quatro sinais se devem aos dois carbonos da cadeia tiazolopentânica que se desdobram em quatro (21,4, 23,7, 26,6, 27,5 ppm) pela influência das diferentes alquilações Na e Nβ; iii) os dois carbonos do grupo α-tetrazolil-ω-hidroxil-etila são mais sensíveis ao diferente ambiente químico proporcionado pelas diferentes alquilações (Na e Nβ) e se desdobram em 6 sinais diferentes por causa dos três possíveis isômeros alquilados (30,0, 49,3, 55,3, 59,0, 59,6 e 62,8 ppm). O espectro de correlação HMQC (Figura LV – Anexo II, página XXXII) corrobora com esta atribuição e toda uma discussão análoga a esta

efetuada pode ser igualmente aplicada aos outros compostos tetrazólicos alquilados preparados. Além disso, na preparação do composto **11** também detectou-se a presença de um produto trialquilado, por meio da espectrometria de massas ESI-MS.

**Tabela 6. Dados de Espectros obtidos dos produtos 9-12**

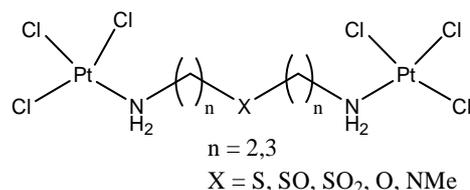
| Análise<br>Produto | RMN <sup>1</sup> H / δ   | RMN <sup>13</sup> C / δ   | IR (cm <sup>-1</sup> )  | ESI -MS<br>(m/z)  |
|--------------------|--|---|---|---|
| <b>9</b>           | 1,89 -2,00 ( <b>H1</b> e <b>H1'</b> , m),<br>2,49 -2,63 ( <b>H2'</b> , m),<br>2,87-3,00 ( <b>H2</b> , m)<br>3,38 ( <b>H4</b> , s), 3,75-3,77<br>( <b>H5'</b> , m), 3,87-3,89 ( <b>H6</b> ,<br>m), 4,38 ( <b>H4'</b> , t)<br>4,61 ( <b>H5</b> , t)  | <sup>13</sup> C (DMSO-d <sup>6</sup> ): 21,4 ( <b>C2'</b> ),<br>23,7 ( <b>C2'</b> ), 26,6 ( <b>C1</b> ), 27,5<br>( <b>C1'</b> ), 30,0 ( <b>C2</b> ), 49,3 ( <b>C4</b> ),<br>55,3 ( <b>C5</b> ), 59,0 ( <b>C5'</b> ), 59,6<br>( <b>C5'</b> ), 62,8 ( <b>C4</b> ), 155,5<br>( <b>C3'</b> ), 165,3 ( <b>C3</b> )   | 3320 (v O-H), 2926<br>(v C-H), 1642 (v<br>C=N), 1067 (v C-<br>O)      | [M+H] <sup>+</sup> =<br>315<br>[M+Na] <sup>+</sup> =<br>337                                   |
| <b>10</b>          | 2,30-2,58 ( <b>H1</b> e <b>H1'</b> , m),<br>3,37-3,49 e 2,99-3,14<br>( <b>H2</b> e <b>H2'</b> , m)<br>3,87 ( <b>H7</b> ), 4,14( <b>H5</b> , t),<br>4,90 ( <b>H4</b> , t), 5,10-5,18<br>( <b>H6</b> , m)  | <sup>13</sup> C (DMSO-d <sup>6</sup> ): 21,0 ( <b>C2'</b> ),<br>23,6 ( <b>C2'</b> ), 26,2 ( <b>C5</b> ), 27,4<br>( <b>C5'</b> ), 29,9 ( <b>C2</b> ), 31,9 ( <b>C1</b> ),<br>35,2 ( <b>C1'</b> ), 42,3 ( <b>C4'</b> ), 43,5<br>( <b>C6</b> ), 49,6 ( <b>C4</b> ), 57,1 ( <b>C6'</b> ),<br>57,2 ( <b>C6'</b> ), 57,3 ( <b>C6'</b> ),<br>154,3 ( <b>C3'</b> ), 165,3 ( <b>C3</b> ) | 3358 (v O-H),<br>2932, 2877 (v C-<br>H),1640 (v C=N),<br>1055 (v C-O) | [M+Na] <sup>+</sup> =<br>365  |
| <b>11</b>          | 1,97 ( <b>H2</b> e <b>H2'</b> , m), 2,59<br>( <b>H1</b> e <b>H1'</b> , m), 2,93 ( <b>H3</b><br>e <b>H3'</b> , m), 3,39 ( <b>H5</b> , s),<br>3,49 ( <b>H7</b> , m), 3,88-3,75<br>( <b>H6</b> , m), 4,38 ( <b>H5'</b> , m),<br>4,62 ( <b>H5</b> , m) | <sup>13</sup> C (DMSO-d <sup>6</sup> ): 21,4 ( <b>C3'</b> ),<br>23,7 ( <b>C3</b> ), 26,5 ( <b>C1'</b> ), 27,5<br>( <b>C1</b> ), 30,0 ( <b>C2</b> ), 49,22<br>( <b>C5'</b> ), 55,3 ( <b>C5'</b> ), 59,0<br>( <b>C6</b> ), 59,6 ( <b>C6'</b> ), 62,8 ( <b>C5</b> ),<br>155,5 ( <b>C4'</b> ), 165,3 ( <b>C4</b> )  | 3329 (v O-H), 2939<br>(v C-H), 1644(v<br>C=N), 1067 (v C-<br>O)       | [M+H] <sup>+</sup> =<br>343<br>[M+Na] <sup>+</sup> =<br>365<br>[M+M+Na] <sup>+</sup><br>= 707 |
| <b>12</b>          | 1,76-2,07 ( <b>H2</b> , <b>H2'</b> , <b>H6</b> ,<br><b>H6'</b> , m), 2,50-2,56 ( <b>H1</b> e<br><b>H1'</b> , m), 2,79-2,96 ( <b>H3</b> e<br><b>H3'</b> , m), 3,35-3,66 ( <b>H7</b> e<br><b>H7'</b> ), 4,33 e 4,61 ( <b>H5'</b> e<br><b>H5</b> ,t)  | <sup>13</sup> C (DMSO-d <sup>6</sup> ): 21,1 ( <b>C4</b> ),<br>23,6 ( <b>C3</b> ), 26,3 ( <b>C1'</b> ), 27,4<br>( <b>C1</b> ), 29,9 ( <b>C2'</b> ), 31,9 ( <b>C2</b> ),<br>35,2 ( <b>C5'</b> ), 43,5 ( <b>C5</b> ), 49,6<br>( <b>C7</b> ), 57,2 ( <b>C7'</b> ), 57,3 ( <b>C7'</b> )',<br>154,6 ( <b>C4'</b> ), 165,3 ( <b>C4</b> )  | 3369 (v O-H), 2926<br>(v C-H), 1645 (v<br>C=N), 1057 (v C-<br>O)      | [M+H] <sup>+</sup> =<br>371<br>[M+Na] <sup>+</sup> =<br>393                                   |

Todavia, como Finnegan (Finnegan e Henry, 1962) havia relatado uma reação similar da formação de haletos de alquila a partir de isômeros tetrazólicos análogos aos preparados neste trabalho, e ainda tentando-se obter os derivados tioureidos substituídos correspondentes propostos, procurou-se mesmo com a mistura de isômeros hidroxilados, preparar o cloreto de alquila **13**, a partir de **9**, pelas reações com cloreto de tionilla (SOCl<sub>2</sub>) ou com cloreto de tionila na presença de lutidina. Mesmo assim não foi possível obter o produto esperado, pois durante a reação observava-se o escurecimento do substrato por possível formação de produtos poliméricos escuros e hidrossolúveis que não puderam ser nem isolados tampouco caracterizados.

### 3.3 – Obtenção de $\alpha,\omega$ -diaminas e Complexos de Platina

Dentre os grupos farmacofóricos mais comuns na clínica médica para tratamento de determinadas enfermidades, entre elas o câncer e IFIs, destacam-se os compostos que apresentam interação com o DNA, como já citado anteriormente no texto desta tese (**Figuras 11 e 12**, páginas 24 e 25), dentre eles os conhecidos como agentes alquilantes e os complexos de platina (Rajski e Williams, 1998; Gabriel, 2007). Embora a cis-platina tenha sido descrita há mais de 150 anos, é ainda reconhecidamente, um potente agente antitumoral (Rajski e Williams, 1998). Cis-Pt tem conhecida atividade contra uma série de linhagens de câncer, mas o seu uso é limitado devido à variedade de efeitos adversos (nefrotoxicidade, mielossupressão, vômitos etc.), por isso, outros complexos análogos à cis-Pt têm sido investigados desde os anos 80. Assim, tem sido planejados novos complexos de platina que possam diminuir MDR e aumentar a atividade do fármaco, tais complexos foram planejados modificando-se ligantes ou mesmo modificando-se os grupos abandonadores cloretos (Hibbert *et al.*, 1929; Finnegan e Henry, 1962). Entre outros derivados de complexos de platina destacam-se os complexos dinucleares de platina que tem se mostrado muito promissores (Farrell e Qu, 1989; Farrell *et al.*, 1995) e esta grande potencialidade tem crescido tanto que atualmente pode-se inclusive afirmar, como em importante artigo de revisão, (Kelland, 2007) que há um ressurgimento da quimioterapia antineoplásica baseada em novos complexos de aminas e platina.

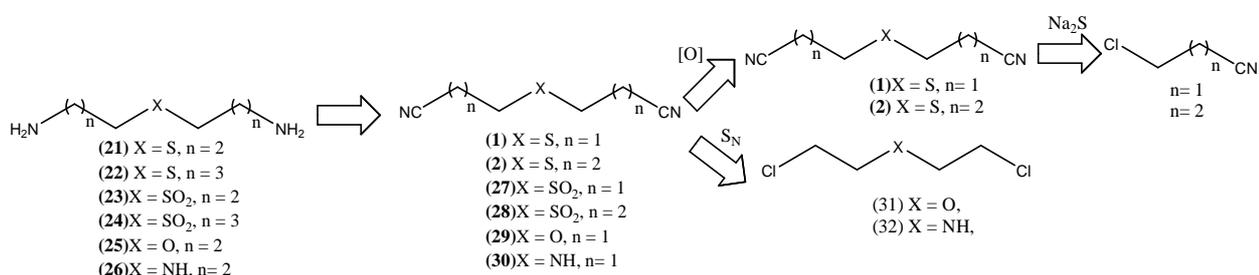
Com a finalidade de obtenção dos complexos que se encontram na **Figura 43**, baseamos-nos em Farrel e Qu (Farrell e Qu, 1989) que prepararam complexos similares aos que foram planejados, no entanto a partir de *cis-Pt* e *trans-Pt*. Todavia, esta preparação se mostrou um tanto quanto longa, resolveu-se preparar complexos a partir de  $K_2PtCl_4$  obtendo-se então os complexos que se encontram na **Figura 43**.



**Figura 43. Complexos derivados de  $\alpha,\omega$ -diaminas propostos para a tese.**

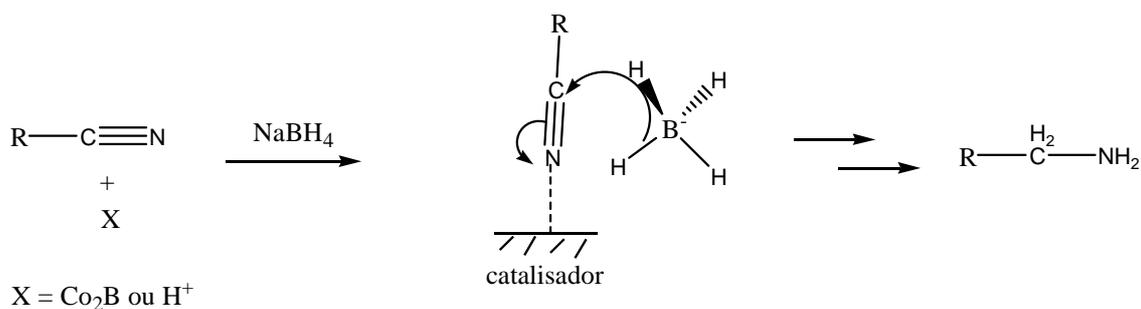
Visando a síntese de novos complexos de platina com  $\alpha,\omega$ -diaminas, buscou-se sintetizar estes ligantes nitrogenados (**Figura 44**). Cabe ressaltar que estas unidades estruturais foram racionalizadas previamente por cálculos preliminares de modelagem molecular por colaboradores do grupo LASELORG-QUIM. A rota sugerida no início do projeto se baseava em duas propostas que envolviam a preparação de aminas à partir redução de precursores dinitrila (**Figura 44**), sendo que as dinitrilas **1** e **2** já haviam sido preparadas e caracterizadas como

citado anteriormente; mas, cabe aqui destacar que a obtenção da dinitrila éter **29** a partir do di-haleto (Harrison e Diehl, 1955) como descrito na **Figura 44** não foi bem-sucedida em nenhuma das tentativas efetuadas.



**Figura 44. Retrossíntese de aminas propostas para a tese.**

Com estas nitrilas, tentou-se, primeiramente a redução direta aos derivados amínicos **21** e **22**, utilizando o método de Osby com Co<sub>2</sub>B (Osby *et al.*, 1986), também utilizando a técnica descrita por Taki com NaBH<sub>4</sub> em ácido trifluoracético e o método Brown na presença de tricloreto de alumínio e diglima (Brown e Rao, 1956; Taki *et al.*, 2008). A princípio, estas metodologias se mostraram promissoras, pois o tempo reacional era baixo e os rendimentos relatados eram altos; contudo, as diversas tentativas a partir de dinitrilas (algumas mostradas na **Tabela 7**, na página 58) apresentavam baixo rendimento reacional, além disso algumas delas até mesmo não produziram os produtos desejados, ou mesmo as reações não se completavam. Estas reações devem envolver a formação *in situ* de boreto de cobalto (Co<sub>2</sub>B) como catalisador, ou a ativação da nitrila para redução por meio de ácido trifluoracético (**Figura 45**) (Osby *et al.*, 1986; Taki *et al.*, 2008)



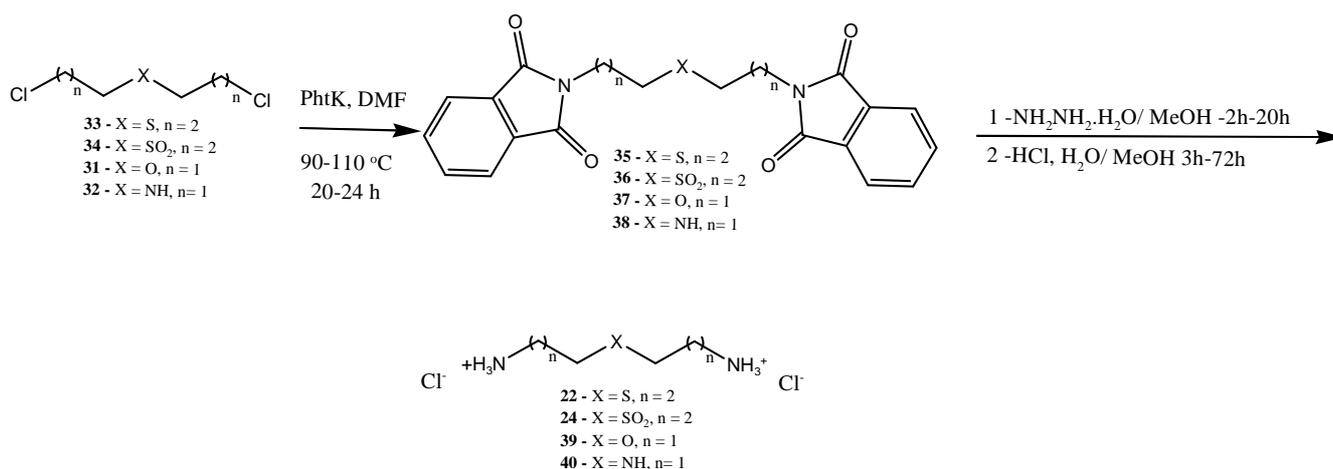
**Figura 45. Mecanismo de reação proposto por Osby e colaboradores (Osby et al., 1986).**

**Tabela 7. Tentativas de preparação de aminas a partir de precursores nitrilas**

| Amina     | Reagentes   | Condições  | Método de Separação   | [Referência]                |
|-----------|---|--|---|-----------------------------|
| <b>21</b> | CoCl <sub>2</sub> : 1,83 g (14 mmol)<br>NaBH <sub>4</sub> : 2,6 g (68 mmol)<br><b>1*</b> : 0,5 g (3,6 mmol)           | Solvente: Metanol<br>Temperatura: ambiente<br>Tempo: 6 h             | 2 mL de NH <sub>4</sub> OH<br>Centrifugação<br>Evaporação<br>Extração com água e clorofórmio          | (Osby <i>et al.</i> , 1986) |
| <b>21</b> | CoCl <sub>2</sub> : 0,46 g (3,6 mmol)<br>NaBH <sub>4</sub> : 0,65 g (68 mmol)<br><b>1*</b> : 0,5 g (3,6 mmol)         | Solvente: Metanol anidro<br>Temperatura: ambiente<br>Tempo: 6 h      | Filtragem<br>2 mL de NH <sub>4</sub> OH<br>Extração com água e clorofórmio                            | (Osby <i>et al.</i> , 1986) |
| <b>21</b> | CF <sub>3</sub> COOH: 22 µL (0,4 mmol)<br>NaBH <sub>4</sub> : 1,0 g (27 mmol)<br><b>1*</b> : 0,5 g (3,6 mmol)         | Solvente: THF<br>Micro-ondas<br>Tempo: 3,5 min                       | 1 mL de NH <sub>4</sub> OH<br>Extração com água e clorofórmio   | (Taki <i>et al.</i> , 2008) |
| <b>21</b> | CF <sub>3</sub> COOH: 6 µL (0,1 mmol)<br>NaBH <sub>4</sub> : 4,6 g (121 mmol)<br><b>1*</b> : 2,0 g (14 mmol)          | Solvente: THF<br>Temperatura: ambiente<br>Tempo: 21 h                | HCl <sub>conc</sub><br>Filtragem<br>NaOH (6 M)<br>Extração com acetato de etila                       | (Taki <i>et al.</i> , 2008) |
| <b>21</b> | CoCl <sub>2</sub> : 1,8 g (14 mmol)<br>NaBH <sub>4</sub> : 4,61 g (122 mmol)<br><b>1*</b> : 1,0 g (7,1 mmol)          | Solvente: Metanol anidro<br>Temperatura: ambiente<br>Tempo: 2 h      | 10 mL de NH <sub>4</sub> OH<br>Extração com acetona, diclorometano                                    | (Osby <i>et al.</i> , 1986) |
| <b>21</b> | CoCl <sub>2</sub> : 173 mg (0,7 mmol)<br>NaBH <sub>4</sub> : 1,1 g (29 mmol)<br><b>1*</b> : 1,0 g (7,1 mmol)          | Solvente: THF e Água<br>Temperatura: ambiente<br>Tempo: 5 h          | 1,5 mL NH <sub>4</sub> OH<br>Filtragem<br>Extração com diclorometano<br>Recristalização em etanol     | (Osby <i>et al.</i> , 1986) |
| <b>21</b> | NaBH <sub>4</sub> : 0,4 g (11 mmol)<br>AlCl <sub>3</sub> : 0,3 (2,4 mmol)<br><b>1*</b> : 0,5 g (3,6 mmol)             | Solvente: Diglima<br>Temperatura: ambiente<br>Tempo: 2 h             | Não reagiu  | (Brown e Rao, 1956)         |
| <b>21</b> | NaBH <sub>4</sub> : 0,4 g (11 mmol)<br>AlCl <sub>3</sub> : 0,3 (2,4 mmol)<br><b>1*</b> : 0,5 g (3,6 mmol)             | Solvente: Diglima<br>Temperatura: 50 °C<br>Tempo: 18 h               | HCl<br>Evaporação do solvente<br>Recristalização com isopropanol e água<br>Extração com diclorometano | (Brown e Rao, 1956)         |
| <b>22</b> | Co <sub>2</sub> B: 76 mg (0,59 mmol)<br><b>2*</b> : 0,5 g (3,0 mmol)  | Solvente: THF: Metanol (2:1)<br>Temperatura: Ambiente<br>Tempo: 22 h | 2 mL de NH <sub>4</sub> OH<br>Centrifugação<br>Evaporação<br>Extração com água e clorofórmio          | (Osby <i>et al.</i> , 1986) |
| <b>22</b> | CH <sub>3</sub> COOH(glacial): 361 µL (6 mmol)<br>NaBH <sub>4</sub> : 0,9 g (24 mmol)<br><b>2*</b> : 0,5 g (3,0 mmol) | Solvente: THF<br>Temperatura: ambiente<br>Tempo: 48 h                | 2 mL de NH <sub>4</sub> OH<br>Extração com clorofórmio e éter etílico                                 | (Taki <i>et al.</i> , 2008) |
| <b>22</b> | CoCl <sub>2</sub> : 3,9 g (30 mmol)<br>NaBH <sub>4</sub> : 5,7 g (150 mmol)<br><b>2*</b> : 1,0 g (6,0 mmol)           | Metanol anidro<br>Temperatura: ambiente<br>Tempo: 4h                 | 10 mL de NH <sub>4</sub> OH<br>Extração com éter etílico, clorofórmio e água                          | (Osby <i>et al.</i> , 1986) |

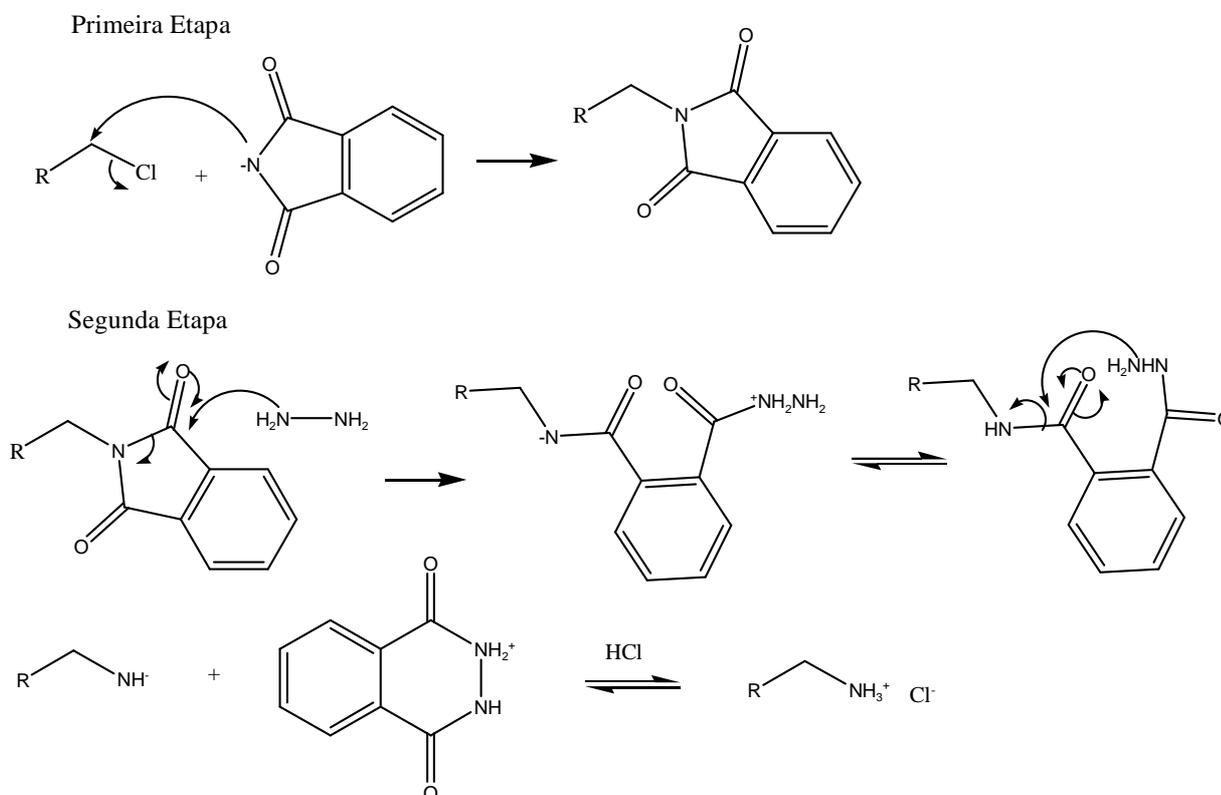
\*\*1,5-bis(nitril)-3-tiapentano: **1**, **Figura 28** \*\* 1,7-bis(7-dinitril)-4-tiaheptano : **2**, **Figura 28**

Perante o insucesso, após exaustivas tentativas destas reações, buscaram-se na literatura rotas alternativas para síntese de aminas primárias: a síntese de Gabriel (Gabriel, 1887; Mitsunobu, 1991), que é uma forma de se obter aminas primárias a partir de haletos de alquila primários através de alquilação de ftalimida potássica. Assim a rota foi modificada conforme rota sintética na **Figura 46** (página 59), assim as etapas de síntese desta nova rota sintética serão detalhadas a seguir.



**Figura 46. Rota sintética geral de aminas preparadas para a tese.**

O mecanismo da reação de Gabriel (**Figura 47**) envolve a formação de bis-ftamilda à partir de uma reação de substituição nucleofílica do tipo S<sub>N</sub>2, na segunda etapa ocorre uma substituição carbonílica. No caso dos compostos preparados, notou-se a formação de sal de diamino hidrazinaftálico, no entanto a separação deste sal ocorreu por adição de solução de ácido clorídrico concentrado (Edwards *et al.*, 1990).



**Figura 47. Mecanismo proposto para síntese de Gabriel.**

A primeira etapa da síntese de Gabriel (**Figura 47**) envolve uma reação de substituição nucleofílica entre o derivado haleto de alquila e ftalimida de potássio, esta reação ocorre em temperaturas altas (100-120 °C) e o tempo de reação ficou em torno de 18-24 h. Todas as preparações nesta etapa são portanto muito longas, existindo na literatura uma série de procedimentos descritos que indicam que as reações podem ocorrer em menor intervalo de tempo, no entanto, as mesmas não se completam em menos de 24 h. Além disso, há uma grande dificuldade de retirar o excesso de ftalimida, por isso é importante manter a proporção 2:1 (ftalimida/dihaleto) mais próxima possível. Os rendimentos obtidos prefiguram na ordem de 60 a 70 % nesta etapa (Tsiakopoulos *et al.*, 2002). Quanto aos reagentes e produtos obtidos (**Figura 46**), é importante ressaltar que, dos precursores di-haleto, apenas o reagente **32** foi adquirido comercialmente, todos os outros (**31**, **33** e **34**) foram preparados.

A segunda etapa da reação envolve a clivagem hidrolítica na presença de hidrato de hidrazina, seguida pela adição de ácido clorídrico. Todos os derivados amínicos **22**, **24**, **39** e **40** foram preparados por esta rota.

Para preparação dos dihaletos **31**, **33** e **34** foram utilizados métodos já estabelecidos na literatura e já efetuados anteriormente no grupo LASELORG-QUIM. A preparação do dihaleto **33** se baseou em uma reação de substituição nucleofílica entre 1-bromo-3-cloropropano e sulfeto de sódio em água e etanol (Furukawa *et al.*, 1984), este precursor foi caracterizado apenas por espectroscopia na região do infravermelho e RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT (**Anexo II**, páginas XLIX-L). O precursor **31** foi obtido a partir de dietilenoglicol utilizando-se um procedimento muito bem estabelecido na literatura que envolve o uso de cloreto de tionila na presença de piridina. O derivado sulfona **34** foi obtido pelo método semelhante, mas devido à sua baixa solubilidade decidiu-se primeiramente preparar a bis-ftalimida **35** que foi então oxidada formando a sulfona bis-ftalimida **36** (**Figura 46**) (Hibbert *et al.*, 1929; Finnegan e Henry, 1962; Levanova *et al.*, 2008).

Como já salientado, uma vez formadas as bis-ftalimidias, partiu-se para a preparação de diaminas planejadas. Na literatura, alguns pesquisadores utilizam apenas ácido clorídrico (em substituição de monohidrato de hidrazina) concentrado para esta etapa, no entanto, muitas vezes, a reação é extremamente lenta (se completa em, no mínimo 48 h), ou simplesmente não completa. Algumas tentativas foram feitas para esta série utilizando-se apenas ácido clorídrico, sendo que apenas o composto **20** foi obtido após 48 h em rendimentos de 80 %. Uma maneira de otimizar o tempo e o rendimento destas reações é utilizando-se hidrato de hidrazina em metanol e refluxo; no caso dos compostos aqui apresentados, todos eles foram obtidos após refluxo de até 16 h e para completar-se a reação utilizou-se ácido clorídrico concentrado entre 3-12 h.

Todos os precursores sintetizados (di-haletos **31**, **33** e bis-ftalimidas **35-38**), bem como as diaminas obtidas **22**, **24**, **39** e **40** nesta etapa foram submetidos à caracterização espectrométrica. Os di-haletos já eram conhecidos na literatura e tiveram sua estrutura comprovada através dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (**Anexo II**) e espectrometria na região do infravermelho. As bis-ftalimidas (**35-38**) também já eram descritas com exceção de **36** e a sua caracterização espectrométrica foi efetuada com análise dos espectros na região do infravermelho (**Anexo II**) que mostraram bandas de  $\nu \text{C=O}$  características de ftalimidas ( $\cong 1695 \text{ cm}^{-1}$ ) e dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  que mostraram, respectivamente, os picos correspondentes ao perfil esperado de um sistema ftalimídico *N*-metilenoalquilado: sinais de hidrogênios aromáticos na região de 7,7 ppm e os sinais metilênicos entre 1,9 e 3,8 ppm (dependendo do derivado – **Tabela 8**, na página 62); um sinal de carbonila ftalimídica em 168 ppm, três sinais dos carbonos aromáticos ftalimídicos (em 123, 132, 134 ppm) e os correspondentes aos carbonos metilênicos (**Tabela 8**, na página 62). Cabe ainda ressaltar que os dados comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  encontram-se na **Tabela II** do **Anexo I**.

Os espectros de massas ESI-MS (**Anexo II**) também confirmaram a obtenção das bis-ftalimidas, pois as massas das substâncias foram observadas na forma de adutos e/ou dímeros protonados e/ou sodiados:  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  e  $[\text{M}+\text{M}+\text{Na}]^+$  (**Tabela 8**, na página 62). A obtenção bem-sucedida das diaminas desejadas foi confirmada pelo perfil característico dos espectros na região do infravermelho, que se mostraram totalmente diferentes dos precursores ftalimídicos; bem como através da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  que evidenciaram a ausência de sinais característicos de ftalimidas precursoras, além da presença dos picos característicos de diaminas protonadas. Finalmente análise dos dados de espectro de massas ESI-MS mostraram os picos referentes aos adutos de diaminas  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (**Tabela 8**, na página 62).

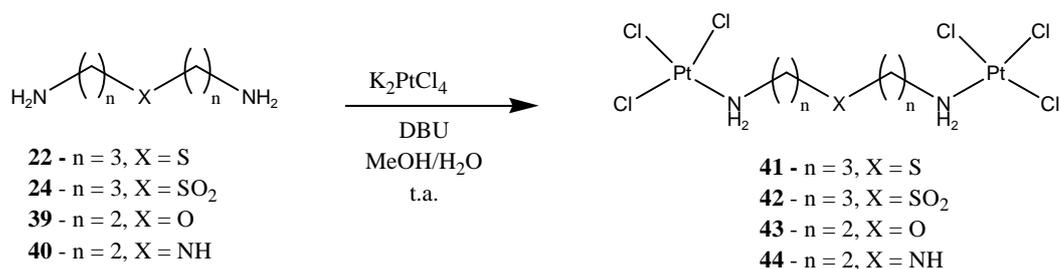
**Tabela 8. Dados de espectros obtidos dos produtos dicloretos, bis-ftalimidados e diaminas**

| Análise<br>Produto | Solvente<br>RMN <sup>1</sup> H / δ<br>RMN <sup>13</sup> C / δ   | IV (cm <sup>-1</sup> )   | ESI -MS<br>(m/z)  |
|--------------------|---|--|---|
| <b>33</b>          | <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): 1,97 (H2, qt, J <sup>1,2</sup> = 7, 4H), 2,67 (H3, t, J <sup>1,2</sup> = 7, 4H), 3,65 (H3, t, J <sup>1,2</sup> =7, 4H)<br><sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ): 28,9 (C1), 32,0 (C2), 43,3 (C3)  | 2956, 2917 (ν C-H);<br>1244 (δ CH <sub>2</sub> -Cl); 761 (ν C-Cl)  | -   |
| <b>31</b>          | <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): 3,6 (H2, J <sup>1,2</sup> =5,5, 4H); 3,8 (H1, J <sup>1,2</sup> =5,5, 4H)<br><sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ): 42,6 (C2); 71,3 (C1)   | 2963, 2863 (ν C-H); 1120 (δ CH <sub>2</sub> -Cl); 665 (ν C-Cl)   | -   |
| <b>35</b>          | <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): 1,92 (H2, qt, J <sup>2,3</sup> =7, 4H), 2,57 (H1, t, J <sup>1,2</sup> =7, 4H); 3,79 (H3, t, J <sup>1,2</sup> =7, 4H), 7,73 (H7, m, J <sup>1,2</sup> =7, 4H), 7,81 (H6, m, J <sup>1,2</sup> = 7, 4H)<br><sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ): 28,1 (C1), 29,1 (C2), 36,9 (C3), 123,0 (C6), 131,9 (C7), 133,8 (C5), 168,1 (C4) | 1695 (ν C=O de ftalimidados);<br>1395 (ν C-N); 716 (νC=C anel aromático)   | [M+H] <sup>+</sup><br>409<br>[M+Na] <sup>+</sup><br>431                                 |
| <b>36</b>          | <sup>1</sup> H (DMSO-d <sup>6</sup> ): 1,94 (H2, m, J <sup>2,3</sup> =5, 4H); 3,16 (H1, m, J <sup>1,2</sup> = 5, 4H); 3,64 (H3, m, J <sup>1,2</sup> = 5, 4H); 7,8 (H6 e H7, 8H)<br><sup>13</sup> C (DMSO-d <sup>6</sup> ): 20,6 (C2); 36,1 (C3); 49,3 (C1); 122,9 (C6); 131,7 (C5); 134,2 (C7); 167,9 (C4)  | 1699 (ν C=O de ftalimidados);<br>1393 (ν C-N); 717 (νC=C anel aromático)   | [M+Na] <sup>+</sup><br>463<br>[M+M+Na] <sup>+</sup><br>903                              |
| <b>37</b>          | <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): 3,73 (H1, t, J <sup>1,2</sup> =4,8, 4H); 3,85 (H2, t, J <sup>1,2</sup> =4,8, 4H); 7,70 (H5, H6, d, 8H)<br><sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ): 37,2 (C2); 67,4 (C1); 123,1 (C5); 132,0 (C4); 133,7 (C6); 168,1 (C3)   | 1706 (ν C=O de ftalimidados);<br>1361 (ν C-N); 720 (νC=C anel aromático)   | [M+Na] <sup>+</sup><br>387<br>[M+M+Na] <sup>+</sup><br>751                              |
| <b>38</b>          | <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): 2,96 (H1, t, J <sup>1,2</sup> = 6, 4H); 3,77 (H2, t, 4H- J <sup>1,2</sup> =6, 4H); 7,69 (H5, H6, m, 8H)<br><sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ): 37,5 (C2); 47,1 (C1); 123,1 (C5); 132,1 (C4); 133,7 (C6); 168,4 (C3)  | 1702 (ν C=O de ftalimidados);<br>1394 (ν C-N); 718 (νC=C anel aromático)   | [M+H] <sup>+</sup><br>364<br>[M+Na] <sup>+</sup><br>386<br>[M+M+Na] <sup>+</sup><br>750 |
| <b>22</b>          | <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O): 1,79 (H2, qt, J <sup>2,3</sup> =7, 4H); 2,50 (H1, t, J <sup>1,2</sup> =7, 4H); 2,93 (H3, t, J <sup>1,2</sup> =7,4H)<br><sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O): 26,2 (C1); 27,4 (C2); 38,3 (C3)   | 2960, 2888 (ν N-H amina protonada); 2042 (banda de combinação N-H); 1621, 1490 (δ NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )   | [M+H] <sup>+</sup><br>149   |
| <b>24</b>          | <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O): 2,0 (H2, qt, J <sup>1,2</sup> = 7,5, 4H); 2,5 (H3, t, J <sup>2,3</sup> =7,5, 4H), 2,9 (H1, t, J <sup>2,3</sup> =7,5, 4H)<br><sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O): 19,2 (C2), 37,7 (C3), 49,0 (C1)  | 3371, 2931 (ν N-H amina protonada); 2069 (banda de combinação N-H); 1615, 1508 (δ NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ), 1285, 1116 (ν SO <sub>2</sub> simétrico e não-simétrico) | [M+H] <sup>+</sup><br>181   |
| <b>39</b>          | <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O): 3,1 (H2, 4H); 3,7 (H1, 4H)<br><sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O): 39,1(C2); 66,3 (C1)  | 3375, 2883 (ν N-H amina protonada); 2000 (banda de combinação N-H); 1490, 1096 (δ NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )   | [M+H] <sup>+</sup><br>105<br>[M+M+H] <sup>+</sup><br>209                                |
| <b>40</b>          | <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O): 3,13(H2, 4H); 3,67(H1, 4H)<br><sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O): 39,0 (C2); 66,2 (C1)   | 2940, 2892(ν N-H amina protonada); 2820 a 2440 (banda de combinação N-H); 1530, 1011 (δ NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )   | [M+Na] <sup>+</sup><br>126  |

\*\*\*d= duplete, t= tripleto, m= multiplete, qt = quinteto

Uma vez sintetizadas as diaminas desejadas, foram preparados os correspondentes complexos de platina a partir da reação das diaminas com K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> em metanol e água. O método de preparação foi análogo ao de Farrell e Qu (Farrell e Qu, 1989), substituindo-se a base citada pelos autores, trietilamina (Et<sub>3</sub>N) por uma base menos complexante, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) (**Figura 48**, na página 63). Para a preparação destes

complexos contou-se com a colaboração da professora Maria Helena de Araújo (setor de Química Inorgânica do DQ/UFMG).

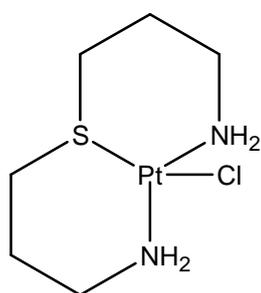


**Figura 48. Rota sintética proposta para obtenção dos complexos.**

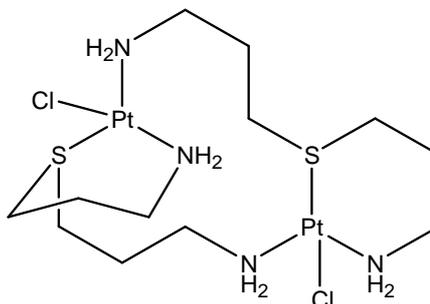
Inicialmente, as reações de complexação foram feitas com o derivado sulfeto diamina **22** e obteve-se um sólido amarelado que foi caracterizado como sendo o derivado **41a** (Figura 49). Entre as técnicas espectrométricas utilizadas para caracterização, ESI-MS (Figuras CXXI e CXXII – Anexo II) foi a mais importante e útil, pois mostrou, em primeiro lugar a pureza do composto obtido; além do mais, observou-se o pico principal com  $m/z$  379,05, compatível com a estrutura **41a** (razão platina(I)/ligante **22** 1:1 monocloreto **41a**). Contudo, uma análise detalhada do perfil de picos satélites mostra cinco sinais principais, sendo que a platina apresenta três isótopos principais, a saber: 193,96 (M-1, 97 %), 194,96 (M, 100 %), 195,96 (M+1, 75 %) e o cloro, 34,97 (M, 100 %) e 36,96 (M+2, 32 %), assim em um complexo de platina como proposto (para **41a**) há uma contribuição no espectro de massas para um perfil com seis picos satélites principais M-1, M, M+1, M+2, M+3 e M+4. Apesar do espectro apresentar um perfil similar, a razão entre as alturas dos picos não é igual à esperada, sendo assim, pode-se propor que, talvez haja também a presença de um outro tipo de complexo no qual tem-se platina(I)/ligante **22** 2:2 dicloreto **41b**; é digno de nota que, apesar deste dímero proposto apresentar massa molecular de 756,6 ele apresenta duas platinas Pt(I) e carga 2+, portanto a relação  $m/z$  379 conforme estrutura **41b**. Cabe destacar que a fragmentação do íon molecular de maior abundância  $m/z$  379,05 gerou os seguintes picos principais: 361,93 [M-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 342,97 [M-2NH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 325,93 [M-NH<sub>4</sub>Cl]<sup>+</sup>.

Todavia a total caracterização estrutural do composto obtido nesta última reação só será possível com realização de espectro de RMN de Pt e espectro na região do infravermelho de baixa frequência para observação das bandas da ligação metal-ligante, medidas de condutimetria, e caso se obtenha um monocristal deste composto, por cristalografia de Raio - X. Cabe destacar que análise TG (termogravimetria) e DTG (termogravimetria diferencial) efetuada em atmosfera de nitrogênio mostrou que a decomposição ocorre em quatro estágios principais: primeiramente ocorre desidratação (43,5 °C), depois ocorrem perdas de massa em 236 °C (9,1 %), 273 °C (16,3 %) e 346 °C (28,5 %) o complexo se mostrou estável até 180 °C

e deve haver produção de platina metálica em temperaturas próximas a 406 °C (**Figura CXXIII, Anexo II**).



**41a** (*m/z* 379)



**41b** (*m/z* 379 (100%))

**Figura 49. Possíveis estruturas do composto obtido pela reação de complexação entre 22 e  $K_2PtCl_4$ .**

Visando a preparação dos demais complexos (**42-44 – Figura 48**), foram feitas diversas tentativas (**Tabela 9**, na página 65): utilizando condições similares às da preparação do complexo **41**; utilizando DBU como base, ou mesmo, preparando *in situ* o ligante desejado; em sistema com oxigênio; em sistema com atmosfera inerte; alterando a proporção ligante: metal etc. Entretanto, observou-se que, em todos os demais casos, ocorreu a formação de um sólido preto proveniente da oxidação da platina. Como é possível observar, com todas as tentativas feitas apenas um complexo foi sintetizado e caracterizado, **41**, pois todas as outras tentativas de preparação levaram à oxidação da platina. É digno de nota que tem-se tentado exaustivamente otimizar os métodos para que a preparação dos complexos propostos seja efetivada.

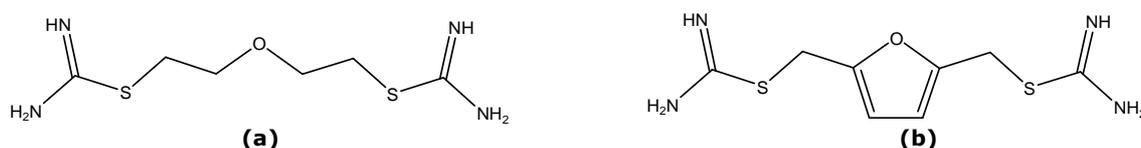
**Tabela 9. Tentativas de preparação de complexos compostos por platina.**

| <b>Ligante: K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub><br/>(Proporção)</b>      | <b>Condições</b>   | <b>Produto Obtido</b>                               |
|--|--|---|
| <b>22 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,48 mmol : 0,48 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 5 mL de água adicionou-se durante 2 h <b>22</b> em 5 mL de solução 1:1 MeOH/água. Agitação, temperatura ambiente, 2 h. Recristalização do sólido na geladeira.  | <b>41</b>   |
| <b>24 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,24 mmol : 0,24 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 5 mL de água adicionou-se durante 2 h <b>24</b> em 72 µL DBU 5 mL de solução 1:1 MeOH/água. Agitação, temperatura ambiente, 2 h. Recristalização do sólido na geladeira.  | <b>42</b><br>Não observado, com oxidação de platina |
| <b>24 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,12 mmol : 0,12 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 5 mL de água/MeOH (1:1) adicionou-se durante 2 h <b>24</b> em 53 µL solução NaOH (18 %) e 10 mL de solução 1:1 MeOH/água. Agitação, temperatura ambiente, 2 h. Recristalização do sólido na geladeira.          | <b>42</b><br>Não observado, com oxidação de platina |
| <b>39 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,24 mmol : 0,24 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 1 mL de MeOH adicionou-se durante 2 h <b>39</b> em 72 µL DBU e 5 mL de solução 1 mL MeOH. Agitação, temperatura ambiente, ambiente inerte (N <sub>2</sub> ), 24 h.  | <b>43</b><br>Sólido marrom, platina oxidada         |
| <b>39 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,48 mmol : 0,48 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 5 mL de água adicionou-se durante 2 h <b>39</b> em 5 mL de solução 1:1 MeOH/água. Agitação, temperatura ambiente, 2 h.  | <b>43</b><br>Sólido marrom, platina oxidada         |
| <b>39 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,12 mmol : 0,12 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 1 mL de MeOH adicionou-se durante 2 h <b>39</b> em 5 mL de solução 1 mL MeOH. Agitação, temperatura ambiente, ambiente inerte (N <sub>2</sub> ), 2 h.   | <b>43</b><br>Sólido marrom, platina oxidada         |
| <b>39 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,12 mmol : 0,12 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 1 mL de MeOH adicionou-se durante 2 h <b>39</b> em 5 mL de solução 1 mL MeOH. Agitação, temperatura ambiente, ambiente inerte (N <sub>2</sub> ), 2 h.   | <b>43</b><br>Sólido marrom, platina oxidada         |
| <b>39 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,48 mmol : 0,48 mmol | 60 µL de monohidrato de hidrazina, 1 mL de MeOH refluxo por 40 minutos, retirada do solvente à pressão reduzida. Solubilização em 5 mL de solução 1:1 MeOH/água. Adição lenta sobre a mistura de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 5 mL de água. Agitação por 4 h. | <b>43</b><br>Não observado, com oxidação de platina |
| <b>39 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,12 mmol : 0,12 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 5 mL de água/MeOH (1:1) adicionou-se durante 2 h <b>39</b> em 53 µL solução NaOH (18 %) e 10 mL de solução 1:1 MeOH/água. Agitação, temperatura ambiente, 2 h. Recristalização do sólido na geladeira.          | <b>43</b><br>Sólido marrom, platina oxidada         |
| <b>40 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,48 mmol : 0,48 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 5 mL de água adicionou-se durante 2 h <b>40</b> em 5 mL de solução 1:1 MeOH/água. Agitação, temperatura ambiente, 24 h.   | <b>44</b><br>Não observado, com oxidação de platina |
| <b>40 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,24 mmol : 0,48 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 5 mL de água adicionou-se durante 2 h <b>40</b> em 5 mL de solução 1:1 MeOH/água. Agitação, temperatura ambiente, 48 h.   | <b>44</b><br>Não observado, com oxidação de platina |
| <b>40 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,24 mmol : 0,24 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 2,5 mL de água adicionou-se durante 2 h <b>40</b> em 72 mmol de bicarbonato de sódio, 2,5 mL de solução 1:1 MeOH/água. Agitação, temperatura ambiente, ambiente inerte (N <sub>2</sub> ), 48 h.                 | <b>44</b><br>Não observado, com oxidação de platina |
| <b>40 : K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b><br>0,24 mmol : 0,24 mmol | Sobre solução de K <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> em 2,5 mL de acetona adicionou-se durante 2 h <b>40</b> em 2,5 mL de solução acetona. Agitação, temperatura ambiente, ambiente inerte (N <sub>2</sub> ), 48 h.   | <b>44</b><br>Não observado, com oxidação de platina |

### 3.4 – Síntese e Caracterização dos Compostos Bis-tioureidos: Precusores de Análogos Tetra-hidrofuranos

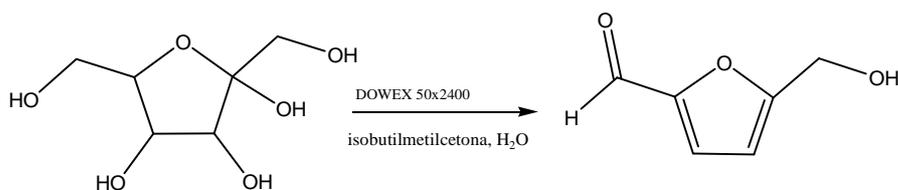
Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisas (LASELORG-QUIM) foram feitos compostos do tipo éter acíclico  $\alpha,\omega$ -bis-S-tioureido substituído **a** e furânicos **b** (**Figura 50**) estes apresentaram boa atividade antifúngica, além disso, foram feitos estudos com outros compostos bioisostéricos tipo amina e sulfeto  $\alpha,\omega$ -bis- que além de terem apresentado atividade antifúngica, também apresentaram atividade antineoplásica (Nogueira, 2006; Almeida, 2011).

Assim, pretendia-se estudar a hidrogenação dos derivados furânicos para obtenção de derivados tetra-hidrofurânicos e testar a atividade farmacológica destes derivados.

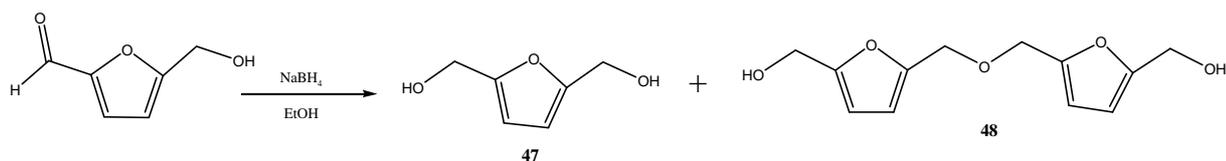


**Figura 50. Compostos do tipo S-tioureido estudados anteriormente: (a) 1,5- bis- S-tioureido-3-oxapentano (b) 2,5-bis-(S-tioureidometil)-furano.**

Para preparação dos produtos planejados para esta série de compostos tetra-hidrofurânicos (**Figura 22**, na página 37), foi planejada a rota sintética partindo-se da frutose (**45**) que foi desidratada por catálise ácida ao composto L-Hidroximetil-5-furano-2-carboxialdeído (HMF- **46**). Há uma série de propostas para a preparação deste precursor, no entanto, a preparação de Hajj e colaboradores (Hajj *et al.*, 1987), entre todas as estudadas se mostrou mais reprodutível (Almeida, 2011). Mesmo assim o rendimento reacional não é satisfatório (30-40 %), além disso, em temperaturas pouco acima de 80 °C a resina utilizada (DOWEX-X2-200 mesh) decompõe-se facilmente, o que compromete muito o rendimento reacional (**Figura 51**). Desta maneira, em 16 h de reação e após coluna cromatográfica em alumina neutra obteve-se o HMF puro, um sólido cor-de-laranja com ponto de fusão 37-39 °C comparável ao obtido na literatura 34-35 °C (Reichstein, 1926).

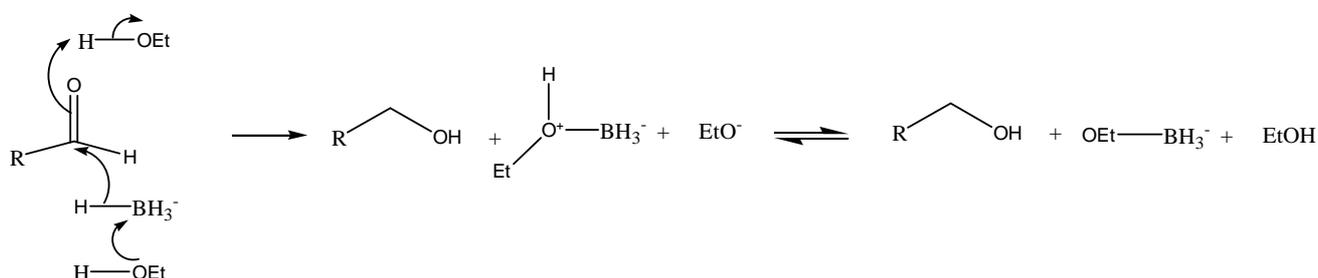


**Figura 51. Rota sintética de obtenção de 46.**



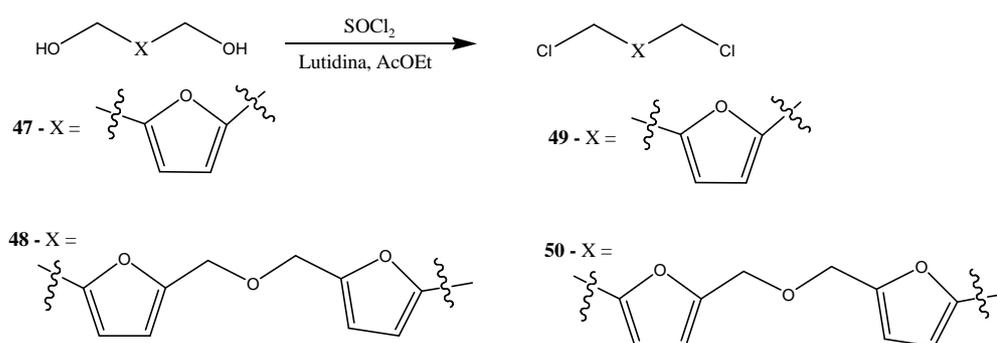
**Figura 52. Esquema de obtenção de 46 e 47.**

Durante uma das preparações do diol 2,5-bis-hidroximetil-furano (**47**) - a partir da redução de **46** na presença de borohidreto de sódio em etanol seco - observou-se, após a recristalização de **47**, a formação de um sólido que surgiu após 72 h de repouso na geladeira, este sólido era o produto dimérico 1,3-bis-[2-furan-(5-hidroximetil)-furanil]-2-oxa-propano (ou 5,5'-[oxibis(metileno)]bis-2-furanometanol - **48**) (**Figura 52**). Assim, ambos os dióis **47** (3,75 mmol - 21 %) e **48** (4,1 mmol - 23 %), foram obtidos e purificados por recristalização seletiva em clorofórmio. Ambos os compostos são sólidos brancos e apresentam, respectivamente, os seguintes faixas de pontos de fusão: 68-70 °C e 57-59 °C. O mecanismo de redução nesta etapa é conhecido (**Figura 53**), sendo que a reação de redução envolve transferência de hidreto ao grupo carbonila e a reação com borohidreto procede na presença de álcool e até mesmo de água, sendo que os intermediários são rapidamente solvatados levando aos derivados hidroxilados (Carey e Sundberg, 2000), além disso, com este agente redutor Na<sup>+</sup> parece não participar do estado de transição (Smith e March, 2007).



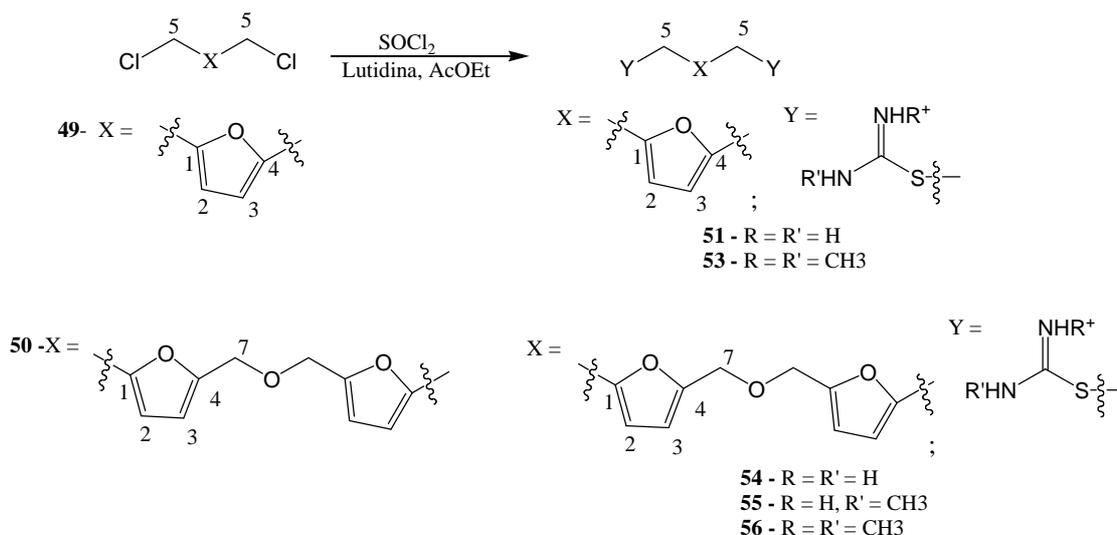
**Figura 53. Mecanismo proposto para redução do grupo aldeído.**

Os compostos di-halogenados (**49** e **50** - **Figura 54**) correspondentes a **47** e **48**, que são os intermediários precursores dos produtos finais tioureido-substituídos, são instáveis (conforme foi possível constatar pelos espectros de RMN) e por isso não foram isolados, assim, tais haletos foram obtidos a partir da reação do álcool correspondente com cloreto de tionila e lutidina (Timko *et al.*, 1977). O mecanismo desta reação também é muito difundido na literatura e envolve a substituição do grupo hidroxila pelo átomo de cloro presente no cloreto de tionila (Smith e March, 2007).



**Figura 54. Rota sintética de obtenção de 49 e 50.**

Para preparação dos compostos S-bis-tioureidos (**Figura 55**), as fases hexânicas obtidas na preparação dos haletos (**49** e **50**) foram adicionadas sobre uma solução de tioureia (ou metil-tioureia, ou 1,3-dimetil-tioureia) em uma mistura 1:1 (vol/vol) de metanol e água. A reação é muito rápida ( $\cong 1$  h), sendo que a solução hexânica, que era amarelada, se torna completamente transparente. O mecanismo proposto para esta reação é do tipo  $\text{S}_{\text{N}}1$ , pois o haleto está ligado a um carbono  $\alpha$ -heteroaromático (Smith e March, 2007).



**Figura 55. Rota sintética de obtenção de bis-tioureidos.**

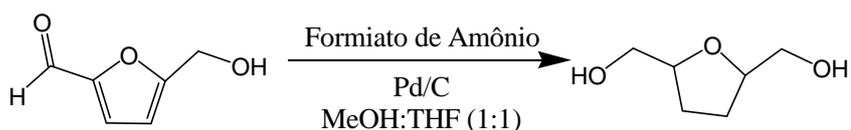
Todos os intermediários sintéticos, com exceção dos di-haletos, foram caracterizados por métodos espectrométricos usuais (**Tabela 10**). Como é de notar, a caracterização espectrométrica do derivado **46** é muito simples, sendo que no espectro de infravermelho (**Anexo II**) observam-se as bandas características de grupo aldeído e de grupo hidroxila:  $\nu$  C-H<sub>(aldeído)</sub> em  $2849 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu$  C=O<sub>(aldeído)</sub>  $1666 \text{ cm}^{-1}$  e  $\nu$  O-H  $3300 \text{ cm}^{-1}$ ; bem como apresentam os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com o perfil padrão de um sistema furânico 2,5-dissubstituído não-simétrico. A partir de **47**, obtido da redução de **46** obtém-se, nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$

(**Tabela 10**, na página 70), além dos sinais referentes aos grupos metileno-substituídos, os sinais de sistemas furânicos 2,5-dissubstituídos simétricos, assim nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  há em todos os sucessivos derivados desta série um sinal referente aos dois hidrogênios heteroaromáticos **H2** e **H3** ( $\beta$ - e  $\delta$ -) magneticamente equivalentes (**Tabela III – Anexo I, Espectro CXXIX– Anexo II**) e nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Espectro CXXX– Anexo II**) dois sinais referentes aos carbonos heteroaromáticos **C2** ( $\beta$ -) e **C3** ( $\delta$ -). O espectro no IV (**Espectro CXXVIII– Anexo II**) de **47** mostrou o perfil característico de compostos hidroxilados (banda larga e intensa  $\cong 3300\text{ cm}^{-1}$ ) além da ausência da banda referente à carbonila do aldeído de partida **46** e banda característica de anel heteroaromático furânico ( $\cong 970\text{ cm}^{-1}$ ); o dímero bis-hidroxilado **48** também mostrou perfil espectral similar na região do infravermelho. Cabe ressaltar que a obtenção do dímero **48** foi confirmada pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Espectro CXXXIV – Anexo II**), pois surpreendentemente, o citado perfil de 2,5-furano-substituídos-simétricos não foi observado: ao invés de três sinais observaram-se seis sinais pareados (55,8 (**C5**) e 63,1 (**C7**); 109,0 (**C2**) e 111,4 (**C3**); 150,6 (**C1**) e 154,2 (**C4**)). O espectro de IV de **48** apresentava duas bandas em 1200 e 1023  $\text{cm}^{-1}$  usualmente atribuídas a grupo éter, assim sugeriu-se que este composto tivesse a estrutura de um éter bis-furânico diol.

Então, devido à instabilidade de **49** e **50**, não foi possível caracterizá-los, mas a obtenção dos derivados bis-tioureidos **51-56** pôde ser confirmada inicialmente pela caracterização do grupo tioureido com bandas em: 3200 e 2900  $\text{cm}^{-1}$  (deformação axial não-simétrica e simétrica de NH protonado), 1620  $\text{cm}^{-1}$  (deformação axial C=N) e 710  $\text{cm}^{-1}$  (deformação axial C-S). Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  a caracterização destes derivados tioureido-substituídos foi evidenciada pelos sinais característicos de carbonos imínicos em 167 ppm e pelos sinais característicos de metilenas ligadas ao átomo de enxofre em 28 ppm, os dados comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  encontram-se na **Tabela III (Anexo I)**. Além do mais, a espectrometria de massas ESI-MS confirmou a obtenção destes derivados tioureidos pela observação nos espectros (**Anexo II**) dos sinais referentes aos íons moleculares protonados  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (**Tabela 10**, na página 70).

Tabela 10. Dados de métodos espectrométricos e espectroscópicos da série de furanos obtidos.

| Análise<br>Produto | Solvente<br>RMN <sup>1</sup> H / δ<br>RMN <sup>13</sup> C / δ   | IV (cm <sup>-1</sup> )  | ESI -MS<br>(m/z)          |
|--------------------|---|---|---------------------------|
| <b>46</b>          | <sup>1</sup> H ( CDCl <sub>3</sub> ): 4,64 ( <b>H6</b> , s, 2H), 6,58 ( <b>H3</b> , d, J <sup>3,4</sup> = 3,6, 1H), 7,22 ( <b>H2</b> , d, J <sup>3,4</sup> = 3,6, 1H), 9,63 ( <b>H5</b> , s, 1H)<br><sup>13</sup> C ( CDCl <sub>3</sub> ): 64,6 ( <b>C6</b> ), 111,9 ( <b>C3</b> ), 122,0 ( <b>C2</b> ), 152,8 ( <b>C1</b> ), 157,2 ( <b>C4</b> ), 177,7 ( <b>C5</b> )                | 3110 (v C-H); 2849 (v C-H aldeído); 1666 (v C=O+v C=C)  | NR                        |
| <b>47</b>          | <sup>1</sup> H ( D <sub>2</sub> O): 4,45 ( <b>H5</b> , s, 4H), 6,25 ( <b>H2</b> , s, 2H)<br><sup>13</sup> C( D <sub>2</sub> O): 55,7 ( <b>C5</b> ), 109,0 ( <b>C2</b> ), 153,6 ( <b>C1</b> )  | 3227 (v O-H), 1000 (v C-O), 969 (δ C=C anel furânico),  | NR                        |
| <b>48</b>          | <sup>1</sup> H ( D <sub>2</sub> O): 4,46 ( <b>H5,H7</b> ,s, 8H), 6,29 ( <b>H2,H3</b> , m, 4H)<br><sup>13</sup> C ( D <sub>2</sub> O): 55,8 ( <b>C5</b> ), 63,1 ( <b>C7</b> ), 109,0 ( <b>C2</b> ), 111,4 ( <b>C3</b> ), 150,6 ( <b>C1</b> ), 154,2 ( <b>C4</b> )  | 3331 (v O-H), 1200 e 1023 (δ C-O-C), 1063(δ O-H) e 974 (δ C=C anel furânico)  | NR                        |
| <b>49</b>          | Imediatamente utilizado   | -   | -                         |
| <b>50</b>          | Imediatamente utilizado   | -   | -                         |
| <b>51</b>          | <sup>1</sup> H ( D <sub>2</sub> O): 3,23 ( <b>H7</b> ,s,1H), 4,35 ( <b>H5</b> , s, 4H), 6,33 ( <b>H2</b> , s, 2H)<br><sup>13</sup> C ( D <sub>2</sub> O): 27,9 ( <b>C5</b> ), 110,7 ( <b>C2</b> ), 148,6 ( <b>C1</b> ), 170,1 ( <b>C6</b> )   | 3172 (v N-H), 2367(v N-H protonado combinação ), 1643 ( v C=N), 1603 (v C=C anel aromático), 1403 e 1347(v anel furânico), 1066 ( δ C-H do anel aromático), 970 (δ C=C anel furânico) | [M+H] <sup>+</sup><br>244 |
| <b>53</b>          | <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O): 2,86 ( <b>H8</b> , s, 6H), 2,93 ( <b>H9</b> , s, 6H), 4,32( <b>H5</b> , s, 4H), 6,30 ( <b>H2</b> , s, 2H)<br><sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O): 28,5 ( <b>C5</b> ), 29,9( <b>C9</b> ), 30,9( <b>C8</b> ), 110,9( <b>C2</b> ), 148,5 ( <b>C1</b> ), 166,4 ( <b>C6</b> )  | 2925(v N-H), 2278(v N-H protonado combinação ), 1611( v C=N), 1449 e 1404(v anel furânico), 1042 ( δ C-H do anel aromático), 970 (δ C=C anel furânico)                                | [M+H] <sup>+</sup><br>301 |
| <b>54</b>          | <sup>1</sup> H( D <sub>2</sub> O): 4,42 ( <b>H5</b> , s, 4H), 4,49 ( <b>H7</b> , s, 4H), 6,40 ( <b>H2</b> , <b>H3</b> , s, 4H)<br><sup>13</sup> C( D <sub>2</sub> O): 28,0 ( <b>C5</b> ), 63,2 ( <b>C7</b> ), 110,6 ( <b>C2</b> ), 111,7 ( <b>C3</b> ), 148,3 ( <b>C1</b> ), 151,5 ( <b>C4</b> ), 170,2 ( <b>C6</b> )   | 3264, 3168(v N-H), 2539, 2410 (v NH <sup>+</sup> ), 2358 (v C=NH <sup>+</sup> ), 1609(v C=N), 1398 (v anel furânico), 1083 ( δ C-H do anel aromático), 970 (δ C=C anel furânico)      | [M+H] <sup>+</sup><br>355 |
| <b>55</b>          | <sup>1</sup> H ( D <sub>2</sub> O): 2,67 ( <b>H8</b> , s), 2,85 ( <b>H9</b> , s), 4,31 ( <b>H5</b> ,s,4H), 4,40 ( <b>H7</b> , s, 4H), 6,30 ( <b>H2</b> , <b>H3</b> , s,4H)<br><sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O): 28,6 ( <b>C5</b> ), 30,1 ( <b>C9</b> ), 63,0 ( <b>C7</b> ), 110,3 ( <b>C2</b> ), 111,6 ( <b>C3</b> ), 148,8 ( <b>C1</b> ), 151,2 ( <b>C4</b> ), 166,2 ( <b>C6</b> ) | 2925(v N-H), 1603 (v C=N), 1297 (v anel furânico), 1017 ( δ C-H do anel aromático), 969 (δ C=C anel furânico)   | [M+H] <sup>+</sup><br>383 |
| <b>56</b>          | <sup>1</sup> H ( D <sub>2</sub> O): 2,78-2,92 ( <b>H9-H11</b> , m), 4,30( <b>H5</b> , s), 4,40 ( <b>H7</b> , s), 6,30 ( <b>H2</b> , <b>H3</b> , s)<br><sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O): 28,6 ( <b>C5</b> ), 29,9 ( <b>C11</b> ), 30,87 ( <b>C9</b> ), 63,0 ( <b>C7</b> ), 110,5 ( <b>C2</b> ), 111,7 ( <b>C3</b> ), 148,5 ( <b>C4</b> ), 151,4 ( <b>C1</b> ), 166,5 ( <b>C6</b> )   | 3246, 2934 (v N-H), 1603(v C=N), 1391, 1271(v anel furânico), 1018 ( δ C-H do anel aromático), 930 (δ C=C anel furânico)  | [M+H] <sup>+</sup><br>411 |

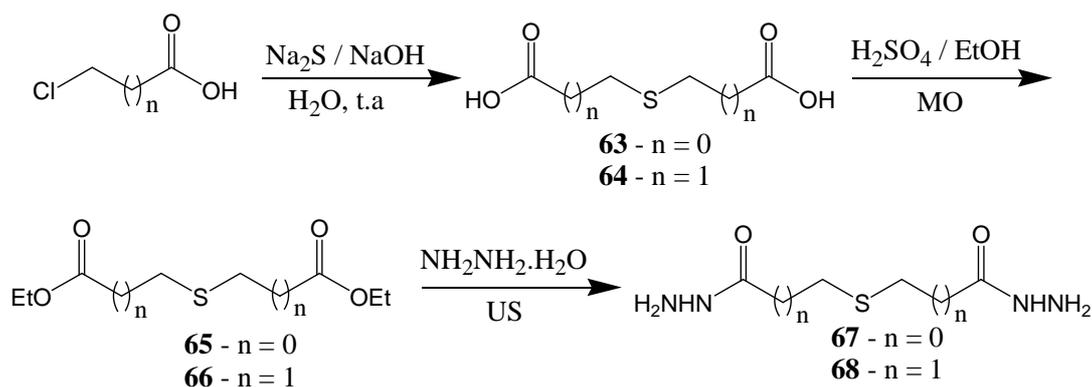


**Figura 56. Rota sintética de tentativa de redução de furanos.**

Na tentativa de obtenção de compostos tetra-hidrofurânicos, a partir da hidrogenação dos correspondentes furanos, utilizou-se primeiramente um composto modelo (**46** - HMF) para constatação experimental da seletividade da redução do grupo aldoxila e do anel heteroaromático. A metodologia utilizada foi a de Nandy (Andrade e Silva, 2006; Nandy *et al.*, 2008) e colaboradores que visa a formação de tetrahidrofuranos pela hidrogenação catalítica dos furanos correspondentes na presença de formiato de amônio (**Figura 56**). Inicialmente, quando a reação foi efetuada conseguiu-se observar, através da análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, a obtenção do tetra-hidrofurano desejado e redução adicional do grupo aldoxila. Contudo, após alguns dias, constatou-se, por meio de espectros de RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), que essa substância não era estável. Assim, tentou-se efetuar a reação de hidrogenação em maior quantidade de furano e de catalisador (Pd/C) para acelerar a redução, mas aparentemente a decomposição do produto ocorria primeiro. Ainda tentou-se reproduzir aquele método anterior, onde se conseguiu isolar o produto tetra-hidrofurânico, procurando efetuar o isolamento mais rapidamente e em maior quantidade, todavia, também observou-se que os próprios precursores furânicos decompõem-se após semanas ou meses da sua preparação. Assim sendo, embora os derivados furânicos tenham apresentado certa atividade farmacológica (de Almeida *et al.*, 2010; Almeida, 2011), decidiu-se não mais prosseguir com a síntese destes derivados tetra-hidrofurânicos e furânicos.

### 3.5 – Síntese e Caracterização dos Compostos hidrazidas

O estudo de atividade biológica de hidrazidas (ou acil-hidrazinas) não é muito comum na literatura mundial, entre tais pesquisas encontram-se atividades antibacterianas e anti-hepatite (Danila, 1980; Waitzberg e Gayotto, 1982; Montanari *et al.*, 1997). A aplicabilidade maior destes compostos é na sua utilização como intermediários sintéticos para a produção de oxadiazóis (Panneerselvam e Ganesh, 2011).



**Figura 57. Rota sintética de compostos hidrazidas.**

A síntese dos derivados sulfetos  $\alpha,\omega$ -di-hidrazinas (**67-68**) foi efetuada segundo a análise sintética da **Figura 57**: partindo-se dos derivados carboxílicos (**63-64**) correspondentes e passando pelos dietil-ésteres (**65-66**) que foram, por sua vez, convertidos nas hidrazidas. A primeira etapa da síntese que envolveu a preparação dos diácidos (**63** e **64**) correspondentes a partir da reação entre, respectivamente, o ácido cloroacético ou ácido cloropropiônico com sulfeto de sódio na presença de hidróxido de sódio em água com rendimentos em torno de 74 -78 %. Cabe ressaltar que a etapa da esterificação foi otimizada pelo uso da irradiação de micro-ondas, sendo que o tempo reduz significativamente para cerca de 24-72 h, pelo método de aquecimento convencional, para 20 a 30 minutos. O mecanismo de esterificação é bem estabelecido na literatura (Carey e Sundberg, 2000) e envolve a ativação da carbonila pela presença de ácido (ácido sulfúrico) e etanol, que é, também o solvente da reação. Após a purificação do respectivo éster, foram preparadas hidrazidas na presença de hidrato de hidrazina e irradiação ultrassônica conforme relatado na literatura (Dabholkar e Gavande), pois, a refluxo, reações similares levam em torno de 5 h para completarem, no entanto, por irradiação de ultrassom as reações terminaram em 37 minutos para **67** e 10 minutos para **68**. Além disso, o mecanismo reacional é similar ao mecanismo de esterificação, no entanto não há presença de ácido para a ativação da carbonila, mas sim a presença de uma base forte que atacará o carbono da carbonila (Carey e Sundberg, 2000). Cabe ressaltar que o derivado hidrazida **67** já foi relatado na literatura como intermediário sintético para a síntese de tiodihidrazonas com atividade antimicrobiana (Kumar *et al.*, 2011).

Todos os reagentes de partida, intermediários e produtos finais, (**63-68**) foram preparados e caracterizados pelas técnicas espectrométricas usuais (**Tabela 11**). Pelos espectros na região do IV foi possível verificar as diferenças entre os grupos funcionais ácido carboxílico, com bandas em torno de  $3300\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  O-H),  $1680\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C=O),  $1400\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-O),  $1290\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta$  O-H); etil-éster com bandas em  $2986\text{-}2864\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$  C-H),  $1725\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu$

C=O), 1267 cm<sup>-1</sup> (ν O-C-C), 1130 cm<sup>-1</sup> e hidrazida com as bandas características em 1120 cm<sup>-1</sup> (ν C-C(=O)-O); 3300 cm<sup>-1</sup> e 3200 cm<sup>-1</sup> (ν N-H), 1625 cm<sup>-1</sup> (ν C=O), 1527 cm<sup>-1</sup>, 1000 cm<sup>-1</sup> (δ N-H) e 950 cm<sup>-1</sup> (ν C-N). Os dados dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de todos estes derivados são compatíveis com o esqueleto carbônico de derivados de ácido tiadiglicólico e de tiadipropiônico, observando-se a variação dos sinais somente nos derivados carbetoxílicos pela presença dos sinais correspondentes (para **65** e **66**), respectivamente: RMN <sup>1</sup>H - 1,26 ppm (6H) e 1,27 ppm (6H); 4,20 ppm (4H) e 4,16 ppm (4H); RMN <sup>13</sup>C -14,0 ppm, 61,4 ppm e 169,7 ppm; 14,0 ppm, 61,5 ppm e 171,6 ppm. Os espectros de massas ESI-MS para ambas as hidrazinas **66** e **67** preparadas mostram os adutos [M+H]<sup>+</sup> e [M+Na]<sup>+</sup> com as massas moleculares condizentes com as estruturas propostas.

**Tabela 11. Dados obtidos de análises espectrométricas e espectroscópicas dos precursores 63 a 68.**

| Análise<br>Produto | Solvente<br>RMN <sup>1</sup> H / δ<br>RMN <sup>13</sup> C / δ   | IR (cm <sup>-1</sup> )   | ESI -MS<br>(m/z)  |
|--------------------|---|--|---|
| <b>63</b>          | <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O): 3,30 (H1)<br><sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O): 33,8 (C1), 173,9 (C2)   | 3300-3000 (ν O-H), 1682 (ν C=O), 1406 (ν C-O), 1294 (δ O-H)          | -   |
| <b>64</b>          | <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O): 2,62 (H2, t, J <sup>1,2</sup> = 6,4, 4H), 2,76 (H1, t, J <sup>1,2</sup> = 6,4, 4H)<br><sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O): 26,0 (C1), 34,0 (C2), 176,5 (C3)   | 3300-3000 (ν O-H), 1685 (ν C=O), 1400 (ν C-O), 1190 (δ O-H)          | -   |
| <b>65</b>          | <sup>1</sup> H(CDCl <sub>3</sub> ): 1,26 (H4, t, J <sup>1,2</sup> = 7, 6H), 3,35 (H1, s, 4H), 4,20 (H3, q, J <sup>1,2</sup> =7, 4H)<br><sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ): 14,0 (C4), 33,5 (C1), 61,4 (C3), 169,7 (C2)  | 2986-2864 (ν C-H), 1726 (ν C=O), 1267 (ν O-C-C), 1120 (ν C-C(=O)-O)  | -   |
| <b>66</b>          | <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ): 1,27 (H5, t, J <sup>1,2</sup> = 7, 6H), 2,60 (H2, t, J <sup>1,2</sup> = 7, 4H), 2,81 (H1, t, J <sup>1,2</sup> = 7, 4H), 4,16 (H4, q, J <sup>1,2</sup> = 7, 4H)<br><sup>13</sup> C(CDCl <sub>3</sub> ): 14,0 (C5), 26,8(C1), 34,6 (C2), 60,5 (C4), 171,6 (C3) | 2978, 2937 (ν C-H), 1725 (ν C=O), 1268 (ν O-C-C), 1130 (ν C-C(=O)-O) | -   |
| <b>67</b>          | <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O): 3,19 (H1)<br><sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O): 33,4 (C1), 170,4 (C2)   | 3280, 3196 (ν N-H), 1623 (ν C=O), 1525, 1009 (δ N-H), 951 (ν C-N)    | [M+H] <sup>+</sup> =<br>179<br>[M+Na] <sup>+</sup> =<br>201 |
| <b>68</b>          | <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O): 2,43 (H2, t, J <sup>1,2</sup> = 6,4, 4H), 2,68 (H1, t, J <sup>1,2</sup> = 6,4, 4H)<br><sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O): 26,7 (C1), 33,5 (C2), 173,1 (C3)   | 3303, 3286(ν N-H), 1626 (ν C=O), 1530, 993 (δ N-H), 947 (ν C-N)      | [M+H] <sup>+</sup> =<br>207<br>[M+Na] <sup>+</sup> =<br>229 |

\*q = quarteto

## 4 - Parte Experimental

### 4.1 – Caracterização dos Compostos

As faixas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF-301 aparelho digital de ponto de fusão da marca Micro-química.

Os espectros na região do infravermelho foram registrados no aparelho ThermoScientific Nicolet 380 FT-IR por ATR (Reflectância Total Atenuada), tanto para os compostos líquidos como para os sólidos. Para a atribuição de bandas no infravermelho utilizaram-se como referência Silverstein e colaboradores (Silverstein *et al.*, 1991; Tools, 2012).

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram registrados nos espectrômetros BRUKER DPX 200 (Departamento de Química, UFMG). Como referência interna foi utilizado o tetrametilsilano.

Para CCD foi utilizada sílica gel 60 G Merck, com espessura de 0,25 mm sobre placas de vidro e para cromatografia em coluna foram utilizadas sílica gel 60 Merck (tamanho de partícula 0,063-0,200 mm – 70-230 mesh ASTM).

Os espectros de massas por ionização por eletrospray foram registrados no espectrômetro LQC Fleet Thermo Scientific no programa Xcalibur™ 2.0.7.

Para análise elementar foi utilizado o analisador CHN Perkin-Elmer (Departamento de química UFMG).

Para análise termogravimétrica foi utilizado o aparelho TG-DTG-60 Shimadzu.

### 4.2 – Purificação de solventes e preparação de reagente

#### 4.2.1 - Dimetilformamida Anidra (DMF)

Em um Erlenmeyer de 2 L foi colocado 1 L de DMF, adicionaram-se 10 g de sulfato de magnésio anidro e agitou-se à temperatura ambiente por 24 h. Filtrou-se, adicionaram-se 5 g de sulfato de cobre anidro e destilou-se à pressão reduzida (Perrin *et al.*, 1980).

#### **4.2.2 – Etanol Anidro**

Em um balão de fundo redondo monotubulado de 1 L acoplado a um condensador de refluxo, foram adicionados 75 mL de etanol e deixou-se aquecer por alguns minutos. Em seguida, adicionaram-se 5,00 g de magnésio metálico e deixou-se aquecer por mais 10 minutos. Adicionou-se 0,50 g de iodo ressublimado e manteve-se o aquecimento por aproximadamente 80 minutos. Adicionou-se mais 0,50 g de iodo ressublimado e aqueceu-se até o desaparecimento completo do iodo na solução. Adicionaram-se mais 500 mL de etanol e adaptando-se a aparelhagem para destilação fracionada, destilou-se o etanol anidro (Morita e Assumpção, 1986).

#### **4.2.3 – Ftalimida de Potássio**

Em um balão monotubulado com condensador para refluxo foram colocados 40 g (0,27 mol) de ftalimida e 800 mL de etanol anidro a mistura foi aquecida gradualmente, por cerca de 15 minutos, para que a maior quantidade possível de ftalimida dissolvesse. Adicionou-se então 15,25 g (0,27 mol) de hidróxido de potássio. O precipitado, ftalimida de potássio foi imediatamente filtrado. A mistura foi mantida em agitação até que atingisse a temperatura ambiente e o precipitado branco obtido foi filtrado. Ambas os sólidos obtidos são constituídos por ftalimida de potássio, que foi secada no dessecador com  $P_2O_5$ , desta maneira foram obtidos 43 g (86 % de rendimento) (Salzberg e Supniewski, 1927).

### **4.3 – Reagentes Utilizados nas Preparações**

A **Tabela 12** na página 76 mostra as principais especificações dos reagentes utilizados nesta tese.

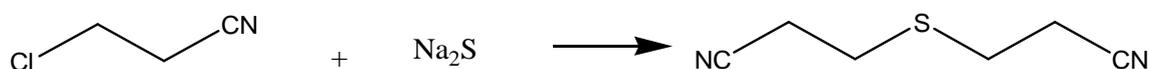
Tabela 12. Lista de reagentes utilizados e marcas dos mesmos.

| Marca         | Reagentes  |
|---------------|--|
| Sigma-Aldrich | 3-cloropropionitrila, 4-clorobutironitrila, frutose, DOWEX 50Wx2-400, DOWEX 50Wx2-200, Tioureia, 1-metil-2-tioureia, 1,3-dimetil-2-tioureia, 1-cloroetanol, 1-cloro-3-propanol, dietilenoglicol, 1-bromo-3-cloropropano, ftalimida, ftalimida de potássio, ácido cloropropiônico, ácido cloroacético |
| Vetec         | Sulfeto de sódio nonahidratado, fluoreto de lítio, periodato de sódio e Sulfato de sódio anidro, pentóxido de fósforo  |
| Merck         | Azida de sódio, monohidrato de hidrazina   |
| Synth         | Hidróxido de sódio, ácido acético glacial, peróxido de hidrogênio  |

## 4.4 – Preparações e Sínteses

### 4.4.1 - Síntese de bis-tetrazóis

#### 4.4.1.1 - Preparação de 1,5-bis-(nitril)-3-tiapentano (**1**) (Nakrasov, 1927)



Em um balão monotubulado, dotado de agitação magnética e acoplado a condensador para refluxo solubilizaram-se 16,0 g (66,7 mmol) de sulfeto de sódio em 25 mL de etanol e adicionaram-se 25 mL de éter etílico. Manteve-se esta mistura em banho de gelo a 0 °C e adicionaram-se, lentamente, 11,9 g (133 mmol) de 3-cloropropionitrila. Manteve-se sob refluxo por 6 h, filtrou-se, evaporou-se e o óleo obtido foi dissolvido em água fervente. Após ser levado ao freezer por 1 noite, descongelou-se a mistura levando-se-a à geladeira por 1 h, e após filtração à baixa temperatura (a vidraria era resfriada previamente na geladeira) foram obtidos 7,16 g (77%) de um sólido transparente de baixo ponto de fusão.

**Aspecto físico:** sólido até 25 °C

**FM:** C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>S

**MM:** 148,3 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura I, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura II, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura III, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 2**, na página 42 e na **Tabela I** do **Anexo I**.

#### 4.4.1.2 - Preparação de 1,7-Bis-(nitril)-4-tia-heptano (2)

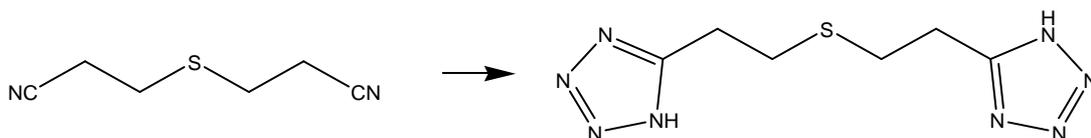


Seguindo-se o procedimento descrito em [4.4.1.1](#) reagiram-se 16,0 g (66,7 mmol) de sulfeto de sódio nonahidratado solubilizados em 50 mL de etanol e 50 mL de éter etílico com 13,8 g (126 mmol) de 4-clorobutironitrila. Após refluxo de 22 h, filtragem, evaporação do solvente, solubilização em água quente e resfriamento *overnight*, foram obtidos 10,42 g (93 %) de um óleo amarelado.

**Aspecto físico:** Líquido      **FM:** C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>S      **MM:** 168,3 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura V, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura VI, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura VII, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 2**, na página 42 e na **Tabela I** do **Anexo I**.

#### 4.4.1.3 - Preparação de 1,5-bis-(tetrazolil)-3-tiapentano (3) (Satzinger, 1960; Kumar, 1987; Pedrosa, 2003)



Em um balão monotubulado, dotado de agitação magnética e acoplado a condensador para refluxo solubilizaram-se 1,25 g (8,93 mmol) de **1** em 10 mL de DMF anidra (**item 4.2.1**), adicionou-se 0,22g (8,48 mmol) de fluoreto de lítio. Agitou-se por 10 min e adicionaram-se 2,23 g (34,3 mmol) de azida de sódio, 1,78 g (33,3 mmol) de cloreto de amônio e 10 mL de DMF. Aqueceu-se a 95°C por 115 h. Evaporou-se a mistura à pressão reduzida, acrescentaram-se 50 mL de água destilada e acrescentou-se solução 3,0 mol/L de ácido sulfúrico até pH= 1. Extraíu-se 3 x 100 mL de clorofórmio para retirar completamente o reagente de partida **1**; a fase aquosa foi aquecida até fervura, para solubilizar a massa sólida grumosa, e após recristalização lenta obtiveram-se 1,52 g (75 %) um sólido após filtração e secagem.

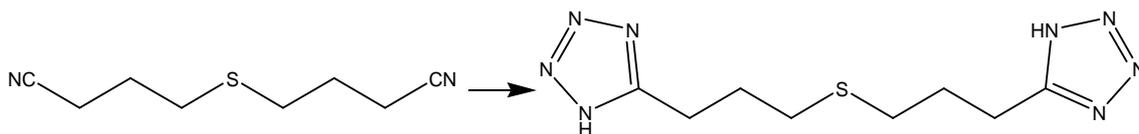
**Aspecto físico:** Sólido branco      **PF:** 148-150 °C      **FM:** C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>8</sub>S      **MM:** 226,1 g.mol<sup>-1</sup>

**Dados de Análise Elementar obtidos:** % C: 31,94, % H: 4,50, % N:49,53

**Dados de Análise Elementar esperados:** % C: 31,85, % H: 4,45, % N: 49,52, % S: 14,17

IV(Figura IX, Anexo II); RMN de  $^1\text{H}$  (Figura X, Anexo II); RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura XI, Anexo II); ESI – MS (Figura XIII, Anexo II): Os dados encontram-se na Tabela 3, na página 46 e na Tabela I do Anexo I encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.4.1.4 - Preparação de 1,7-bis(7-tetrazolil)-4-tia-heptano (4)



Seguindo-se o procedimento descrito em 4.4.1.3 reagiram-se 1,50 g (8,93 mmol) de **2** com 0,22 g (8,5 mmol) de fluoreto de lítio, 2,23 g (34,3 mmol) de azida de sódio, 1,78 g (33,3 mmol) de cloreto de amônio em 20 mL de DMF(item 4.2.1). Aqueceu-se a 95°C durante 120 h e, após evaporação do solvente, acidulação, extração, filtragem e recristalização, foram obtidos 2,17 g (96 %) de um sólido branco.

**Aspecto físico:** Sólido branco **PF:** 125-127 °C **FM:** C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>8</sub>S

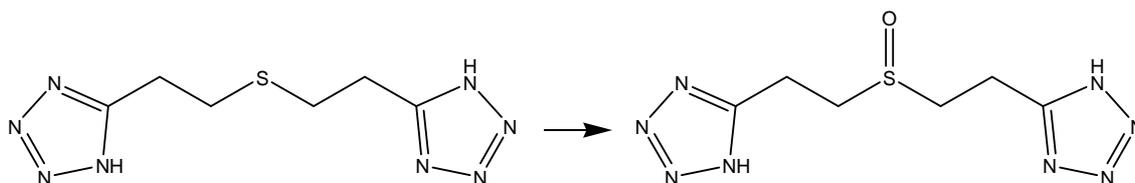
**MM:** 254,1 g.mol<sup>-1</sup>

**Dados de Análise Elementar obtidos:** % C: 37,79, % H: 5,49, % N:44,33

**Dados de Análise Elementar esperados:** %C: 37,78, % H: 5,55, % N: 44,06, % S: 12,61

IV ( $\nu$  /cm<sup>-1</sup>) (Figura XVI, Anexo II); RMN de  $^1\text{H}$  (Figura XVII, Anexo II); RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura XVIII, Anexo II); ESI – MS (Figura XXI, Anexo II): Os dados encontram-se na Tabela 3, na página 46 e na Tabela I do Anexo I encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.4.1.5 - Preparação de 1,5-bis(5-tetrazolil)-3-oxatiapentano (5)(Ogura *et al.*, 1980)



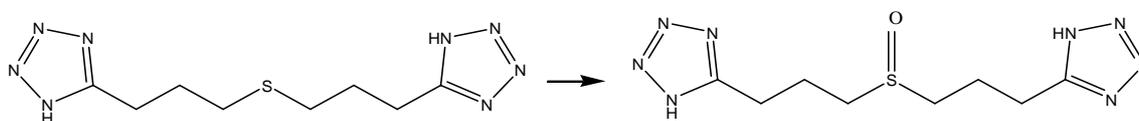
Em um balão monotubulado, dotado de agitação magnética e banho criogênico, com gelo e sal, de modo que o banho manteve-se entre -10 a -5 °C adicionou-se 0,40 g (1,77 mmol) de **3** solubilizado em 10 mL de acetonitrila. Adicionou-se, lentamente, 0,38 g (1,78 mmol) de periodato de sódio solubilizado em 1,0 mL de água destilada. Agitou-se por 2 h, filtrou-se para retirada do iodato de sódio formado, secou-se a solução filtrada com sulfato de sódio anidro, evaporou-se-a sobre baixa pressão até cristalização, obtendo-se após secagem do sólido filtrado 0,34 g (79%) de sólido branco.

**Aspecto físico:** Sólido branco **PF:** 161-163 (decomposição) °C **FM:** C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>8</sub>OS

**MM:** 242,1 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura XXIV, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura XXV, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura XXVI, Anexo II); ESI – MS (Figura XXIX, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 4**, na página 49 e na **Tabela I** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### 4.4.1.6 - Preparação de 1,7-bis(tetrazolil)-4-oxatia-heptano (6)



Seguindo-se o procedimento descrito em 4.4.1.5 reagiu-se 0,31 g (1,22 mmol) de (**4**) solubilizado em 6,5 mL de acetonitrila com 0,26 g de periodato de sódio solubilizado em 3 mL de água destilada. Reagiu-se por 2 h e com procedimento experimental idêntico ao descrito, obteve-se 321 mg (95%) de um sólido amarelo.

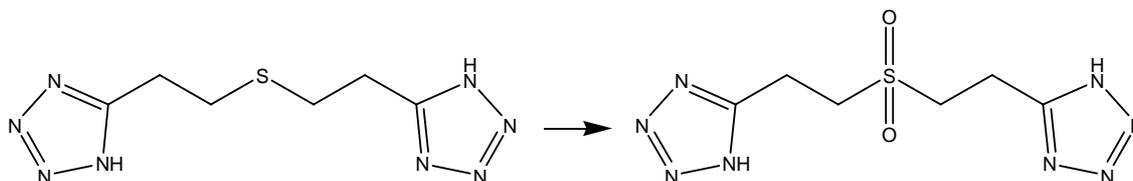
**Aspecto físico:** Sólido amarelo **PF:** 142-143°C (decomposição) **FM:** C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>8</sub>OS

**MM:** 270,3 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura XXXI, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura XXXII, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura XXXIII, Anexo II); ESI – MS (Figura XXXV, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 4**, na página 49 e na **Tabela I** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### 4.4.1.7 - Preparação de 1,7-bis(5-tetrazolil)-3-bisoxatia-heptano

(7) (Drabowicz *et al.*, 1983)



Em um balão monotubulado, dotado de agitação magnética e banho de gelo e sal adicionou-se 0,45 g (1,97 mmol) de (3) e 3,9 mL (66 mmol) de ácido acético glacial, a mistura foi mantida a 0 °C. Adicionaram-se, lentamente, 1,2 mL (10 mmol) de peróxido de hidrogênio 30%. Agitou-se à temperatura ambiente por 23 h. Filtrou-se o sólido formado lavando-se este com solução de ácido clorídrico 2,0 mol/L (50 mL), depois com éter etílico (50 mL) e deixou-se secando ao ar. Obtiveram-se 392 mg de sólido branco que foi recristalizado em água e etanol (9:1) obtendo-se 299 mg (59%) de sólido branco.

**Aspecto físico:** Sólido branco **PF:** 252-254 °C (decomposição) **FM:** C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>8</sub> O<sub>2</sub>S

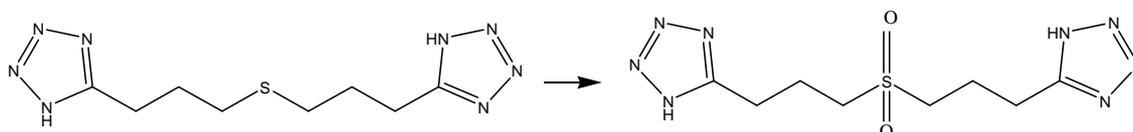
**MM:** 258 g.mol<sup>-1</sup>

**Análise Elementar obtidos:** % C: 28,13, % H: 3,83, % N:43,31

**Análise Elementar esperados:** % C: 27,90, % H: 3,90, % N: 43,39, % O: 12,39, % S:12,42

**IV (Figura XXXVII, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura XXXVIII, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura XXXIX, Anexo II); ESI – MS (Figura XLI, Anexo II):** Os dados encontram-se na Tabela 5, na página 52 e na Tabela I do Anexo I encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### 4.4.1.8 - Preparação de 1,7-bis(tetrazolil)-4-bisoxatia-heptano (8)



Seguindo-se o procedimento descrito em 4.4.1.7 reagiu-se 0,50 g (1,97 mmol) de 4 em 3,9 mL (66 mmol) de ácido acético glacial com 1,2 mL (10 mmol) de peróxido de hidrogênio 30%. Agitou-se por 24 h, após filtragem, lavagem com solução de ácido clorídrico 2,0 mol/L e com éter e secagem, foram obtidos 347 mg (62 %) de sólido branco.

**Aspecto físico:** Sólido branco **PF:** 230 °C (decomposição) **FM:** C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S

**MM:** 286,3 g.mol<sup>-1</sup>

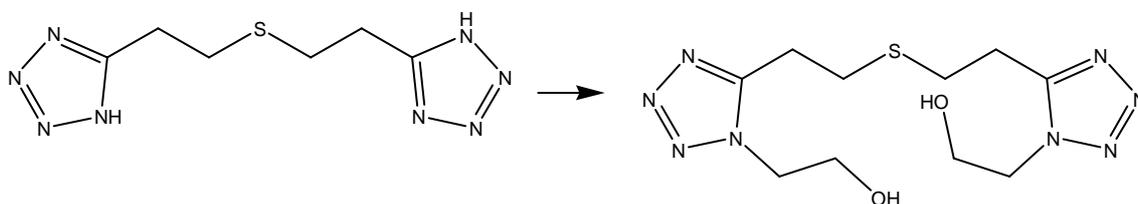
**Dados de CHN obtidos:** % C: 33,44, % H: 4,63 % N: 38,52

**Dados de CHN esperados:** % C: 33,56, % H: 4,93, % N: 39,14, % O: 11,18, % S: 11,20

**IV (Figura XLIII, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura XLIV, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura XLV, Anexo II); ESI – MS (Figura XLIX, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 5**, na página 52 e na **Tabela I** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### 4.4.2 - Síntese de bis-tetrazóis alquilados:

##### 4.4.2.1 – Preparação de 1,5-bis-[1-(2-hidroxietil)-1H-tetrazol-5-il]-3-tia-pentano (**9**)(Chafin *et al.*, 2008)



Em um balão monotubulado, sobre banho de gelo, dotado de agitação magnética contendo uma suspensão contendo 1,5 g (6,6 mmol) de **3** em 15 mL de água, adicionou-se hidróxido de sódio 0,53 g (13,3 mmol) até dissolução; adicionou-se lentamente 1,19 mL (13,3 mmol) de 1-cloroetanol, então a solução foi aquecida a refluxo por 24 h, foi resfriada, o solvente foi retirado à pressão reduzida e o cloreto de sódio foi precipitado pela adição de etanol. Este sólido foi então filtrado, e o extrato etanólico foi evaporado. O produto final foi obtido após coluna cromatográfica em silicagel 60 (fração: 10 % de metanol em acetona). Foram obtidos 2,1 g (72 % de rendimento) de um líquido amarelado, que é constituído da mistura de isômeros de alquilação.

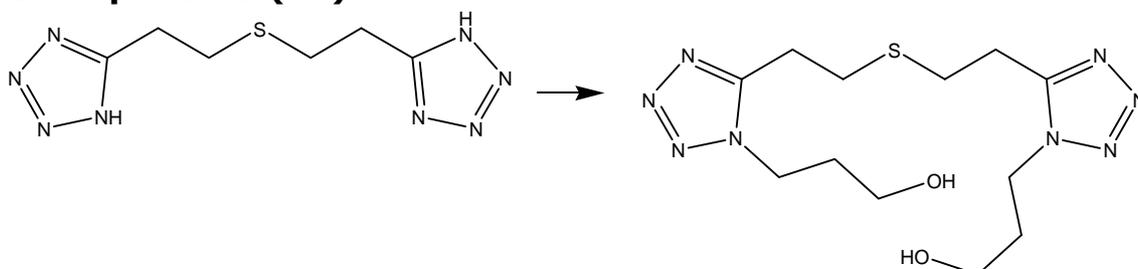
**Aspecto físico:** líquido amarelado **FM:** C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S

**MM:** 314,37 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura LI, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura LII, Anexo II)**

RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura LIII, Anexo II); ESI – MS (Figura LVI, Anexo II): Os dados encontram-se na Tabela 6, na página 55.

#### 4.4.2.2 – Preparação de 1,5-bis-[1-(3-hidroxipropil)-1H-tetrazol-5-il]-3-tia-pentano (10)



Seguindo-se o procedimento geral descrito no item 4.4.2.1 reagiram-se 1,0 g (4,4 mmol) de **3** em 5 mL de água com 460 mg (11 mmol) de hidróxido de sódio e 1,47 mL de 1-cloro-3-propanol. Após 48h de reação, tratamento similar da mistura reacional como descrito acima e separação por coluna cromatográfica, da fração com 20 % de metanol em acetona, foram obtidos 698 mg de uma mistura de isômeros (46 %).

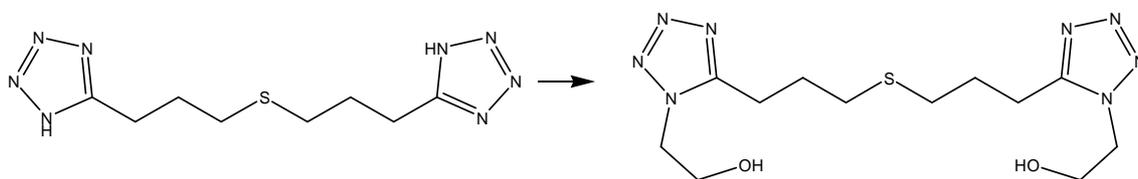
**Aspecto físico:** líquido amarelado **FM:**  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_2\text{S}$

**MM:**  $342,42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**IV** (Figura LVII, Anexo II); RMN de  $^1\text{H}$  (Figura LVIII, Anexo II)

RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura LIX, Anexo II); ESI – MS (Figura LXI, Anexo II): Os dados encontram-se na Tabela 6, na página 55.

#### 4.4.2.3 – Preparação de 1,7-bis-[1-(2-hidroxietil)-1H-tetrazol-5-il]-4-tia-heptano (11)



Seguindo-se o procedimento geral descrito no item 4.4.2.1 reagiram-se 2,5 g (9,8 mmol) de **4** em 15 mL de água com 735 mg (18,4 mmol) de hidróxido de sódio e 1,46 mL de 1-cloroetanol. Após 48h de reação, tratamento similar da mistura reacional como descrito acima e separação por coluna cromatográfica, da fração com 20 % de metanol em acetona foram obtidos 790 mg

de uma mistura de isômeros e da fração com 30 % de metanol em acetona foram obtidos 890 mg de um produto tri-alkilado.

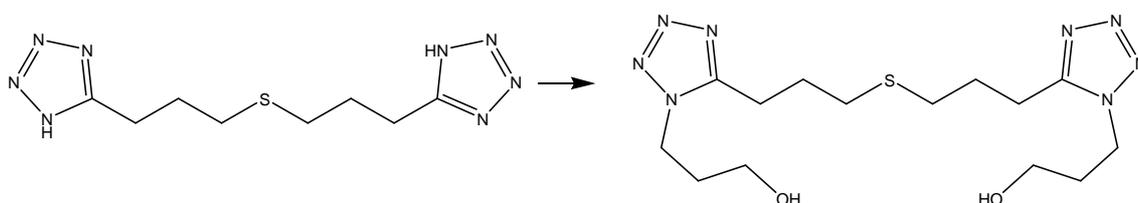
**Aspecto físico:** líquido amarelado **FM:** C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S

**MM:** 342,42 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura LXII, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura LXIII, Anexo II)**

**RMN de <sup>13</sup>C (Figura LXIV, Anexo II); ESI – MS (Figura LXVII, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 6**, na página 55.

#### 4.4.2.4 – Preparação de 1,7-bis-[1-(3-hidroxiopropil)-1H-tetrazol-5-il]-5-tia-heptano (12)



Seguindo-se o procedimento geral descrito no item 4.4.2.1 reagiram-se 1,0 g (4,4 mmol) de **3** em 5 mL de água com 460 mg (11 mmol) de hidróxido de sódio e 1,47 mL de 1-cloro-3-propanol. Após 24h de reação, tratamento similar da mistura reacional como descrito acima e separação por coluna cromatográfica da fração com 100 % de acetato de etila foram obtidos 698 mg de um líquido amarelado (46 % de rendimento).

**Aspecto físico:** líquido amarelado **FM:** C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S

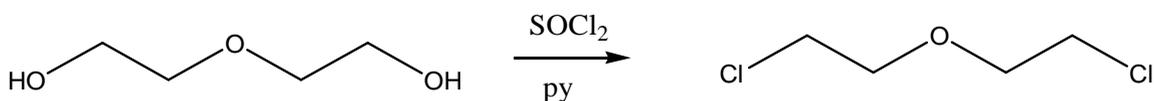
**MM:** 342,42 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura LXVIII, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura LXIX, Anexo II)**

**RMN de <sup>13</sup>C (Figura LXX, Anexo II); ESI – MS (Figura LXXII, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 6**, na página 55.

### 4.4.3 - Síntese de complexos de Platina:

#### 4.4.3.1 - Preparação de Éter bis-(2-cloroetil) etílico (31)



Em um balão monotubulado de 250 mL, sobre banho de gelo, foram colocados 13,27 g (125 mmol) de dietilenoglicol em 23 mL de piridina recém-destilada. Adicionaram-se lentamente 22 mL (303 mmol) de cloreto de tionila recém-destilado. A mistura foi mantida a refluxo por 3 h, após resfriamento, o produto foi extraído com éter dietílico (3 x 100 mL). O extrato etílico obtido foi neutralizado com bicarbonato de sódio, secado com sulfato de sódio anidro, filtrado e evaporado, obtendo-se assim 14,22 g de um líquido pouco viscoso (80 % de rendimento).

**Aspecto físico:** líquido transparente

**FM:** C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>O

**MM:** 143,01 g.mol<sup>-1</sup>

**IV** (Figura LXXXII, Anexo II); **RMN de <sup>1</sup>H** (Figura LXXXIII, Anexo II); **RMN de <sup>13</sup>C** (Figura LXXXIV, Anexo II): Os dados encontram-se na Tabela 8, na página 61 e na Tabela II do Anexo I.

#### 4.4.3.2 - Preparação de 1,7-dicloro-3-tia-heptano (33)



Em um balão monotubulado de 500 mL, dotado de agitação magnética e condensador de refluxo, contendo uma solução de 1-bromo-3-cloropropano (15 g, 96 mmol) em etanol (83 mL) adicionou-se sulfeto de sódio nonahidratado (13,7 g, 46,2 mmol) em 40 mL de água. Após 18 h de refluxo, remoção do etanol, extração com clorofórmio (3 x 100 mL), secagem com sulfato de sódio anidro, retirada do solvente à pressão reduzida e secagem em dessecador contendo pentóxido de fósforo, foram obtidos 8,21 g de um líquido levemente amarelado que foi destilado a pressão reduzida obtendo-se 6,72 g (78 % de rendimento).

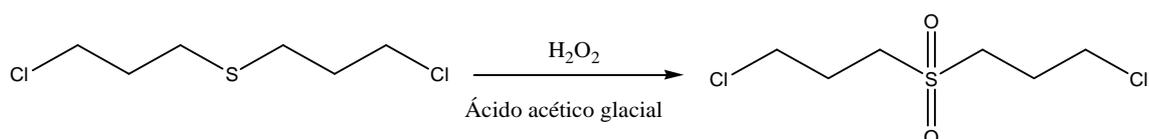
**Aspecto físico:** líquido translúcido

**FM:** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>S

MM: 187,13 g.mol<sup>-1</sup>

IV (Figura LXXXV, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura LXXXVI, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura LXXXVII, Anexo II): Os dados encontram-se na Tabela 8, na página 61 e na Tabela II do Anexo I.

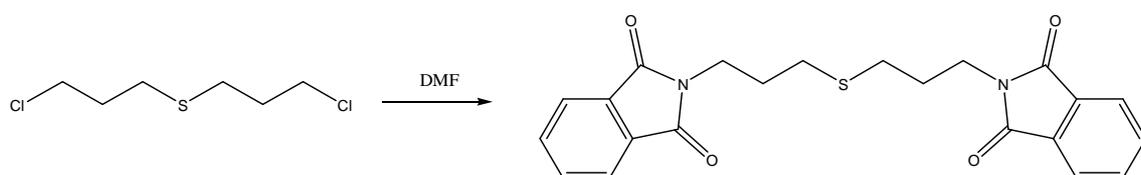
#### 4.4.3.3 - Preparação de de 1,7-dicloro-3-bis-oxatia-heptano (34)



Em um balão monotubulado de 500 mL acoplado a condensador para refluxo, dotado de agitação magnética e sobre banho de gelo, colocaram-se 20,0 g (107 mmol) de **33** adicionaram-se 200 mL (3,3 mol) de ácido acético glacial. Adicionou-se durante 45 minutos 60 mL (530 mmol) de peróxido de hidrogênio (30 %). Agitou-se por 20 h, o sólido precipitado foi filtrado após 24 h de cristalização na geladeira e secado no dessecador contendo P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (72,5 %). O sólido é insolúvel em todos os solventes que tínhamos para análise de RMN e por isso, a rota foi modificada.

**Aspecto físico:** sólido branco      **Ponto de fusão:** 120-123 °C.

#### 4.4.3.4 - Preparação de sulfeto de 3,3'-Tio-bis-(1-ftalimidopropano) (**35**) (Edwards *et al.*, 1990; Tsiakopoulos *et al.*, 2002)



Em um balão monotubulado de 100 mL acoplado a condensador para refluxo e dotado de agitação magnética foram colocados 7,20 g de (38,5 mmol) de **33**, 14,3 g (77,2 mmol) de ftalimida de potássio (item 4.2.3) e 35 mL de DMF (item 4.2.1), a mistura foi aquecida a 105 °C por 20 h. Após o refluxo a mistura foi resfriada a temperatura ambiente, diluída em clorofórmio (100 mL), o extrato orgânico foi lavado com 100 mL de solução de hidróxido de sódio (2 N) e solução saturada com cloreto de sódio (3 x 100 mL); então a fase aquosa foi extraída com clorofórmio (2 x 100 mL). As fases orgânicas foram misturadas, secadas com sulfato de sódio anidro, evaporadas à pressão reduzida, o sólido obtido foi solubilizado em uma

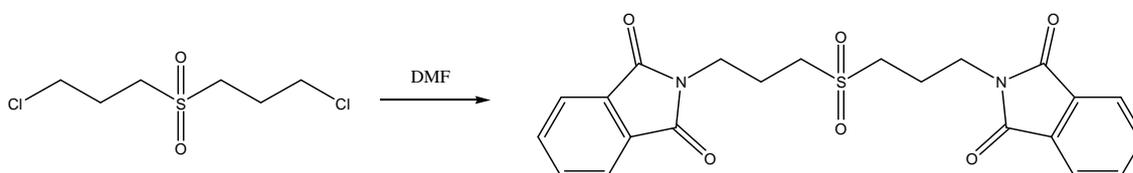
mistura de 1:5 éter/metanol para purificação final por recristalização, filtrado e secado em dessecador contendo P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Foram obtidos 11,9 g de um sólido branco (75 % de rendimento).

**Aspecto físico:** sólido branco      **Ponto de fusão:** 89-91 °C.

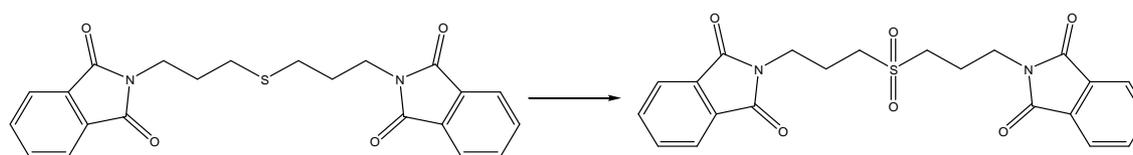
**FM:** C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S      **MM:** 408,47 g.mol<sup>-1</sup>

**IV** (Figura LXXXVIII, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura LXXXIX, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura XC, Anexo II); ESI – MS (Figura XCII, Anexo II): Os dados encontram-se na Tabela 8, na página 61 e na Tabela II do Anexo I encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### 4.4.3.5 - Preparação de 3,3'-dioxatia-bis-(1-ftalimidopropano) (36)



Seguindo-se o procedimento geral descrito em 4.4.3.4 reagiram-se 2,1 g (9,6 mmol) de **34** com 3,6 g de ftalimida de potássio (item 4.2.3) em 3,6 g (19,4 mmol) em 10 mL de DMF (item 4.2.1). Aqueceu-se à 110 °C por 48 h. Repetiram-se os mesmos procedimentos de elaboração do item 4.4.3.4 obtendo-se um sólido branco, pouco solúvel em solventes orgânicos. A análise por ESI-MS deste produto mostrou uma massa diferente da esperada.



Em um balão monotubulado de 100 mL, dotado de agitação magnética, sobre banho de gelo, foram colocados 1,73 g (3,9 mmol) de **35**, 7,88 mL (130 mmol) de ácido acético glacial 2,36 mL (20 mmol) de peróxido de hidrogênio 30%. Agitou-se à temperatura ambiente por 24 h. O sólido obtido foi filtrado e lavado com água (3 x 50 mL). Após secagem no dessecador com P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> foram obtidos 1,55 g de um sólido branco (83 %) de rendimento.

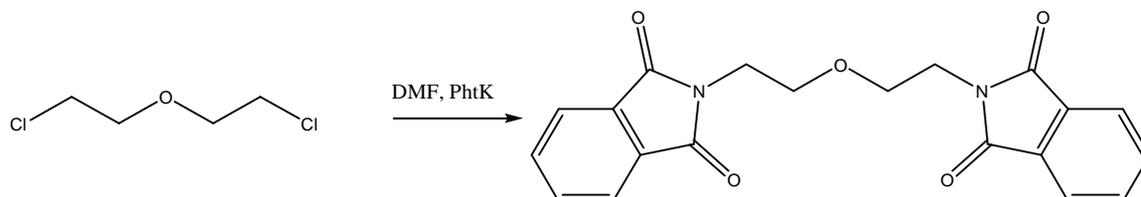
**Aspecto físico:** sólido branco      **Ponto de fusão:** 155-156 °C.

**FM:** C<sub>22</sub> H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S      **MM:** 440,47 g.mol<sup>-1</sup>

**IV** (Figura XCIII, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura XCIV, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura XCV, Anexo II); ESI – MS (Figura XCVII, Anexo II): Os dados encontram-se na Tabela 8,

na página 61 e na **Tabela II** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.4.3.6 - Preparação de 3,3'-oxa-bis(1-ftalimidoetano) (37)



Seguindo-se o procedimento geral descrito em 4.4.3.4 reagiram-se 5,5 g de (38,5 mmol) de **31**, 14,3 g (77,2 mmol) de ftalimida de potássio (**item 4.2.3**) e 35 mL de DMF (**item 4.2.1**), a mistura foi aquecida a  $105\text{ }^\circ\text{C}$  por 20 h. Após refluxo a mistura foi resfriada a temperatura ambiente, diluída em clorofórmio, lavada com 100 mL solução de hidróxido de sódio (2 N) e solução saturada com cloreto de sódio (3 x 100 mL), repetiu-se esta extração por duas vezes. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente à pressão reduzida e triturou-se o sólido obtido em éter etílico e repousou-se no freezer por 18 h. Após filtração e secagem, foram obtidos 11,1 g de um sólido branco (80 % de rendimento).

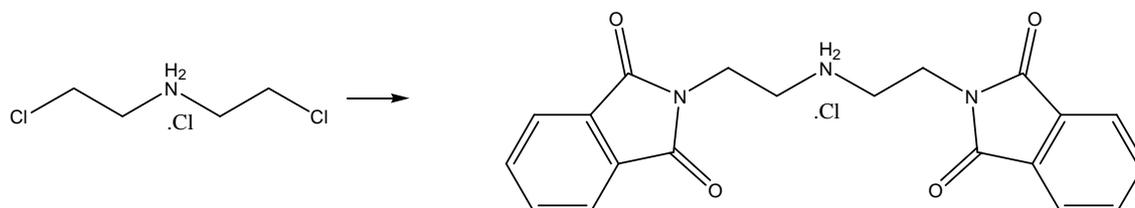
**Aspecto físico:** sólido branco      **Ponto de fusão:**  $151\text{-}157\text{ }^\circ\text{C}$ .

**FM:**  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$

**MM:**  $364,35\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

**IV** (**Figura XCVIII**, **Anexo II**); **RMN de  $^1\text{H}$**  (**Figura XCIX**, **Anexo II**); **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (**Figura C**, **Anexo II**); **ESI – MS** (**Figura CII**, **Anexo II**): Os dados encontram-se na **Tabela 8**, na página 61 e na **Tabela II** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.4.3.7 - Preparação de Hidrocloreto de 1,5-diftaloil-3-dietilenotriamina (38)



Em um balão monotubulado de 500 mL, dotado de agitação magnética e acoplado a condensador para refluxo, foram colocados 10,3 g (57,7 mmol) de hidrocloreto de 2,2'-dicloroetilamina, **32**, 37,7 g (203,5 mmol) de ftalimida de potássio (**item 4.2.3**) em 125 mL de

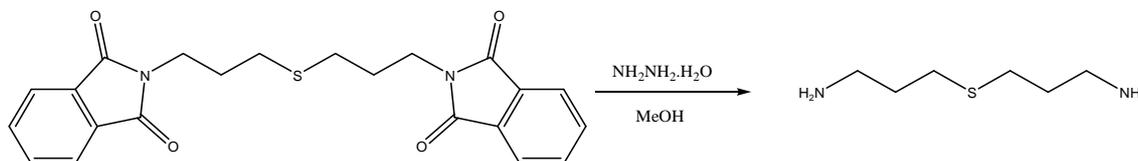
DMF (**item 4.2.1**). Aqueceu-se entre 90-110 °C por 24 h, com a solução ainda quente derramou-se lentamente 125 mL de água gelada, 125 g de gelo e 12,5 g de carbonato de potássio. Após 1 h de agitação o precipitado foi filtrado à pressão reduzida, lavado com água gelada. O sólido foi então dissolvido em clorofórmio e o excesso de ftalimida foi retirado lavando-se uma vez mais com 100 mL de água e três vezes com 100 mL de água saturada com cloreto de sódio. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio, filtrada e evaporada. O sólido rosáceo obtido foi secado em dessecador na presença de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, foram obtidos 13,9 g (66 % rendimento).

**Aspecto físico:** sólido rosa      **Ponto de fusão:** 172-177 °C.

**FM:** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>      **MM:** 399,83 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura CIII, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura CIV, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura CV, Anexo II); ESI – MS (Figura CVII, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 8**, na página 61 e na **Tabela II** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

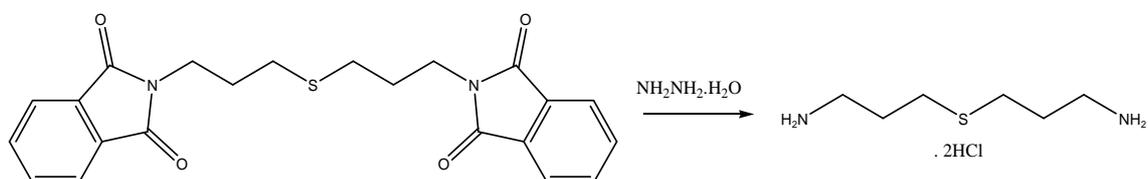
#### 4.4.3.8 - Preparação de 1,7-diamino-4-tia-heptano (**22**) (Edwards *et al.*, 1990; Tsiakopoulos *et al.*, 2002)



Uma suspensão contendo 2,7 g (6,6 mmol) de **35** em 15 mL de metanol e 825 µL de monohidrato de hidrazina foi aquecida a refluxo por 1 h. O sólido obtido foi filtrado, a solução filtrada foi evaporada à pressão reduzida e desta obteve-se o produto planejado na forma de um líquido amarelado bem viscoso (470 mg – 48% de rendimento), cujo espectro de massas apresenta a massa do produto esperado, mas o espectro de RMN ficou com sinais desdobrados.

**FM:** C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>S      **MM:** 148,27 g.mol<sup>-1</sup>

#### 4.4.3.9 - Preparação de di-hidrocloreto de 1,7-diamino-4-tia-heptano (22) (Edwards *et al.*, 1990)



Em um balão monotubulado de 250 mL acoplado a condensador para refluxo e dotado de agitação magnética foram colocados 2,7 g (6,6 mmol) de bisftalimida e 825  $\mu$ L (13,2 mmol) de hidrato de hidrazina em 15 mL de metanol. A mistura foi aquecida por 20 h, o solvente foi retirado à pressão reduzida, ao sólido obtido foram adicionados 20 mL de metanol, 20 mL de água e 40 mL de ácido clorídrico concentrado, refluxou-se por 3 h. A mistura foi resfriada, filtrada, a solução foi concentrada à pressão reduzida e desta foi obtido um líquido amarelo extremamente viscoso (1,24 g, 85 % de rendimento).

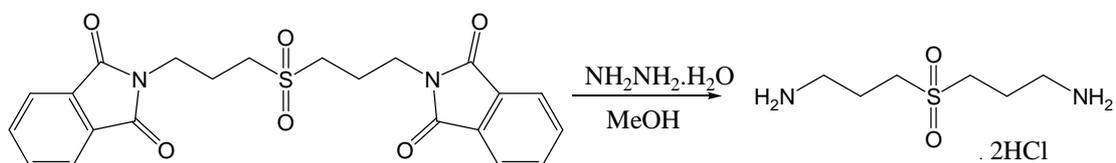
**Aspecto físico:** líquido amarelado

**FM:**  $C_6H_{18}Cl_2N_2S$

**MM:** 221,19  $g \cdot mol^{-1}$

**IV (Figura LXXIII, Anexo II); RMN de  $^1H$  (Figura LXXIV, Anexo II); RMN de  $^{13}C$  (Figura LXXV, Anexo II); ESI – MS (Figura LXXVII, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 8**, na página 61 e na **Tabela II do Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ .

#### 4.4.3.10 - Preparação de di-hidrocloreto de 1,7-diamino-4-bisoxatia-heptano (24) (Edwards *et al.*, 1990)



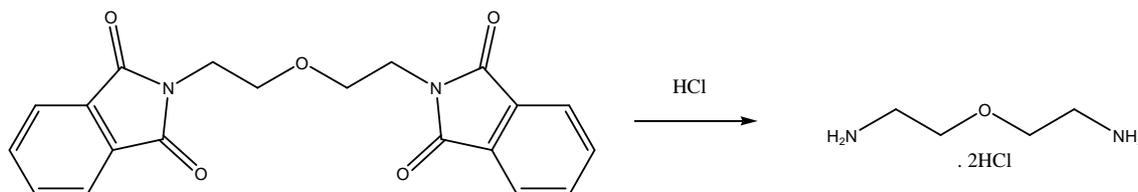
Seguindo-se o procedimento geral [4.4.3.9](#) reagiram-se 0,5 g (1,0 mmol) de bisftalimida com 825  $\mu$ L (13,2 mmol) de hidrato de hidrazina em 15 mL de metanol. Seguiram-se todos os procedimentos descritos no item mencionado. Um líquido amarelado (200 mg-79 %) foi obtido.

**FM:**  $C_6H_{18}Cl_2N_2O_2S$

**MM:** 253,19  $g \cdot mol^{-1}$

IV (Figura LXXVIII, Anexo II); RMN de  $^1\text{H}$  (Figura LXXIX, Anexo II); RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura LXXX, Anexo II); ESI – MS (Figura LXXXI, Anexo II): Os dados encontram-se na Tabela 8, na página 61 e na Tabela II do Anexo I encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.4.3.11– Preparação de di-hidrocloreto de 1,5-diamino-3-oxa-pentano (39)



Seguindo-se o procedimento geral 4.4.3.9 reagiram-se 2,4 g (6,6 mmol) de bisftalimida com 825  $\mu\text{L}$  (13,2 mmol) de hidrato de hidrazina em 15 mL de metanol. Foram realizados todos os procedimentos seguintes prescritos no item mencionado. O sólido amarelo obtido foi recristalizado em uma mistura 1:1 de isopropanol e água, desta maneira foram obtidos 712 mg (61 %) de um sólido branco bastante higroscópico.

**Aspecto físico:** sólido branco

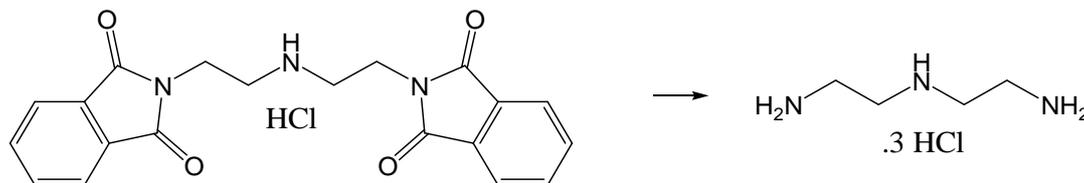
**Ponto de fusão:** 100-112  $^{\circ}\text{C}$

**FM:**  $\text{C}_4\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$

**MM:** 177,07  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

IV (Figura CVIII, Anexo II); RMN de  $^1\text{H}$  (Figura CIX, Anexo II); RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura CX, Anexo II); ESI – MS (Figura CXII, Anexo II): Os dados encontram-se na Tabela 8, na página 61 e na Tabela II do Anexo I encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.4.3.12 - Preparação de Tris-hidrocloreto de 1,5-diamino-3-azapentano (40)



Uma suspensão contendo 2,00 g (5,00 mmol) de bis-ftalimida **38** em 11 mL de solução de ácido clorídrico (6 M) foi refluxada por 72 h. A mistura foi deixada por 1 noite, foi então filtrada à pressão reduzida e lavada quatro vezes com 5 mL de solução de HCl (6 M). Após evaporação

da solução, secagem em dessecador contendo  $P_2O_5$  e filtração foram obtidos 872 mg (82 % de rendimento) de um sólido amarelado.

**Aspecto físico:** sólido branco

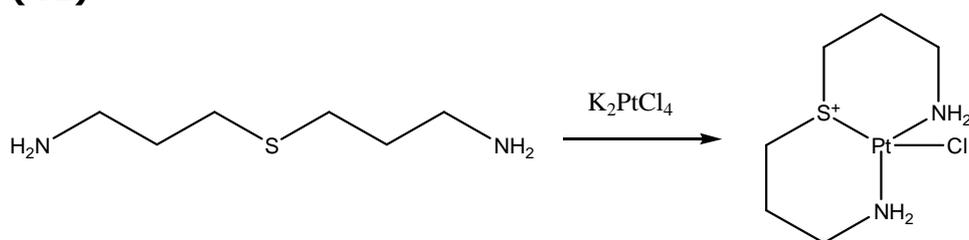
**Ponto de fusão:** 199-200 °C

**FM:**  $C_4H_{16}Cl_3N_3$

**MM:** 212,55  $g \cdot mol^{-1}$

**IV** (Figura CXIII, Anexo II); **RMN de  $^1H$**  (Figura CXIV, Anexo II); **RMN de  $^{13}C$**  (Figura CXV, Anexo II); **ESI – MS** (Figura CXVII, Anexo II): Os dados encontram-se na Tabela 8, na página 61 e na Tabela II do Anexo I encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ .

#### 4.4.3.13 - Preparação de 1,9-diamino-propil-5-sulfanil-cloro-platina (41)



Em um balão monotubulado de 10 mL dotado de agitação magnética preparou-se uma solução contendo 0,2 g de  $K_2PtCl_4$  (0,48 mmol) e 5 mL de água. Adicionou-se, lentamente (durante 2 h) sobre a mesma uma solução contendo 71 mg (0,48 mmol) de diamina em 2,5 mL de metanol e 2,5 mL de água. Após mais 2 h de agitação a mistura ficou em repouso na geladeira por 18 h; após filtração e secagem foram obtidos 201 mg de um sólido amarelo claro (82 % de rendimento).

**Aspecto físico:** sólido amarelo claro

**Ponto de fusão:** 179-180 °C.

**FM:**  $C_6H_{16}ClN_2 PtS$

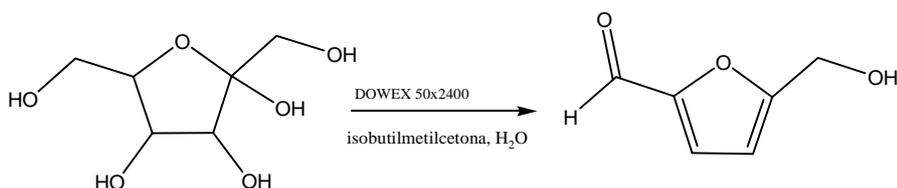
**MM:** 378,8  $g \cdot mol^{-1}$

A discussão dos dados espectrais encontra-se na página 63 desta tese.

**IV** (Figura CXVIII, Anexo II); **RMN de  $^1H$**  (Figura CXIX, Anexo II) **RMN de  $^{13}C$**  (Figura CXX, Anexo II)

#### 4.4.4 - Sínteses de derivados furânico Bis-tiureido-substituídos

##### 4.4.4.1 - Preparação de L-Hidroximetil-5-furano-2-carboxialdeído (45)



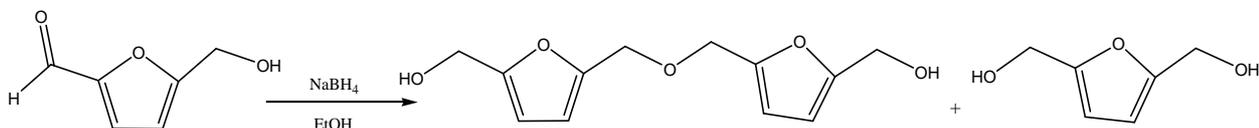
Em um balão bitubulado de 1, 00 L, acoplado a condensador para refluxo e com agitação magnética, colocaram-se 12,5 g (69,40 mmol) de frutose e 7,00 mL de água destilada. Adicionaram-se 46,9 g de resina DOWEX® e 500 mL de isobutilmetilcetona. A mistura foi refluxada e, a cada 2 horas de reação, a fase orgânica foi recolhida, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. O produto obtido nesta etapa foi submetido à purificação por cromatografia em coluna com alumina neutra (26 g) e clorofórmio como eluente. Obtiveram-se 3,024 g (35%) de um sólido cor-de laranja com ponto de fusão de 37-39 °C.

**Aspecto físico:** Sólido Laranja **PF:** 37-39 °C. **FM:** C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

**MM:** 126,1 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura CXXIV, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura CXXV, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura CXXVI, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 10**, na página 69 e na **Tabela III** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

##### 4.4.4.2 - Preparação de 2,5-bis-hidroximetil-furano (47) e 1,3-bis-[2-(5-hidroximetil)-furanil]-2-oxa-propano (48)



Em um balão tritubulado de 250 mL, acoplado a condensador para refluxo e agitação magnética, colocaram-se 2,25 g (17,86 mmol) de L-Hidroximetil-5-furano-2-carboxialdeído **45** e 100 mL de etanol seco. Adicionou-se 0,56 g (14,74 mmol) de NaBH<sub>4</sub> agitou-se à temperatura ambiente por 48 h. À mistura foi adicionado ácido clorídrico concentrado até pH=2 e em seguida ela foi imediatamente neutralizada com solução de bicarbonato de sódio e filtrada. A solução secada com sulfato de sódio anidro, filtrada novamente e o solvente foi evaporado, com

a adição à mistura de clorofórmio fervente ocorre instantânea cristalização gerando, após filtração e secagem, 0,525g (53 %) de 2,5-furanometanol **47**. Após 72 h de cristalização da solução filtrada anteriormente, ocorre outra cristalização, da qual após filtração e secagem obtém-se 0,893 g (47 %) do dímero **48**.

**Aspecto físico:** Sólidos branco **PF(41):** 57-59 °C **PF(42):** 68-70 °C

**FM(41):** C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> **MM (41):** 128,1 g.mol<sup>-1</sup>

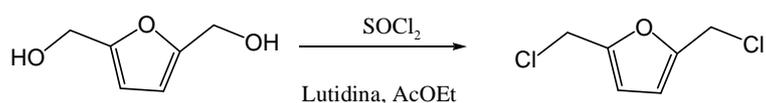
**IV (Figura CXXVIII, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura CXXIX, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura CXXX, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 10**, na página 69

**FM(42):** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> **MM (42):** 238,2 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura CXXXII, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura CXXXIII, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura CXXXIV, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 10**, na página 69 e na **Tabela III** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

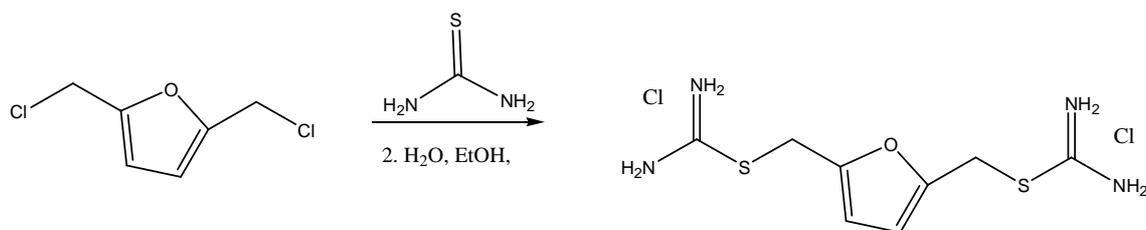
#### 4.4.4.3 - Preparação de 2,5-bis-[S-tioureidometil]-furano(**51**) (Timko *et al.*, 1977)

##### Primeira Etapa: Preparação de 2,5-bis-clorometil-furano (**49**)



Em um balão monotubulado de 100 mL, dotado de agitação magnética, colocou-se 130 mg (1,0 mmol) de **47** em 0,3 mL (2,5 mmol) de lutidina. Adicionou-se, lentamente, 0,20 mL (2,5 mmol) de cloreto de tionila (recém-destilado) diluído em 1,50 mL de acetato de etila. Após 1 h de agitação obteve-se uma mistura alaranjada. Acompanhou-se a reação por CCD, tendo como eluente acetato de etila (r.f. do reagente = 0,85 r.f. do produto = 0,23). Após o tempo de mistura, adicionaram-se 10,0 mL de água e extraiu-se a fase aquosa formada com 10,0 mL de hexano e este extrato orgânico foi reservado para uso imediato na próxima etapa.

##### Segunda Etapa: Obtenção de 2,5-bis-[S-tioureidometil]-furano(**51**)



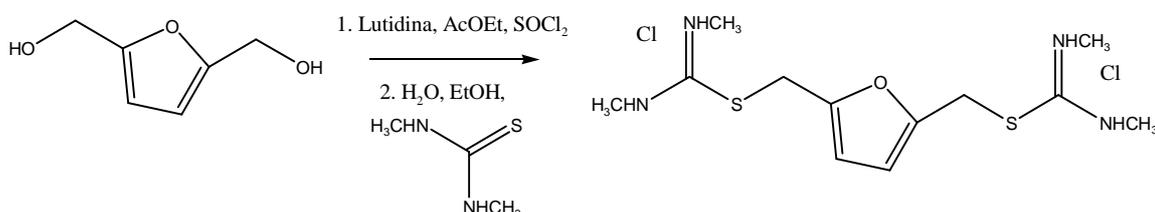
Em um balão monotubulado de 50 mL, dotado de agitação magnética, solubilizaram-se 155 mg (2,0 mmol) de tiourea em 1,00 mL de água e 1,0 mL de etanol. Adicionou-se, sobre esta mistura, a fase orgânica obtida na etapa anterior com o di-haleta **49** bruto. As fases ficam separadas, no entanto, a coloração da fase aquosa fica amarelada enquanto a fase orgânica fica transparente. Então, agitou-se por 1 h e separaram-se as fases obtidas na mistura reacional. Solubilizou-se a fase aquosa em metanol e evaporou-se em pressão reduzida. Ressolubilizou-se em metanol e aguardou-se 72 h para cristalização da tiourea, filtrou-se em membrana milipore obtendo-se obtendo-se 121 mg (38%) de um líquido amarelo extremamente viscoso.

**Aspecto físico:** Líquido amarelado      **FM:** C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>OS<sub>2</sub>

**MM:** 317,3 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura CXXXVI, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura CXXXVII, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura CXXXVIII, Anexo II); ESI – MS (Figura CXL, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 10**, na página 69 e na **Tabela III** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### 4.4.4.4 – Preparação de 2,5-bis-[N,N-dimetil-S-tioureidometil]-furano (53)



Seguindo-se o procedimento geral descrito no item 4.3.3.3 repetiu-se a primeira etapa com as seguintes quantidades: 130 mg de **47**, 0,3 mL de lutidina e 0,2 mL de SOCl<sub>2</sub> em 1,5 mL de acetato de etila. Após adição de água e hexano separou-se a fase orgânica. Diluiu-se 0,23g (2,23 mmol) de 1,3-dimetil-tiourea em 1,00 mL de água e 1,00 mL de etanol. Repetindo-se os mesmos procedimentos de reação e extração foram obtidos 182 mg (52 %) de um líquido viscoso.

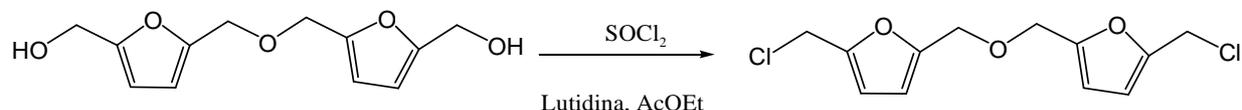
**Aspecto físico:** Líquido amarelado      **FM:** C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>OS<sub>2</sub>

**MM:** 373,4 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura CXLII, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura CXLIII, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura CXLIV, Anexo II); ESI – MS (Figura CXLV, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 10**, na página 69 e na **Tabela III do Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

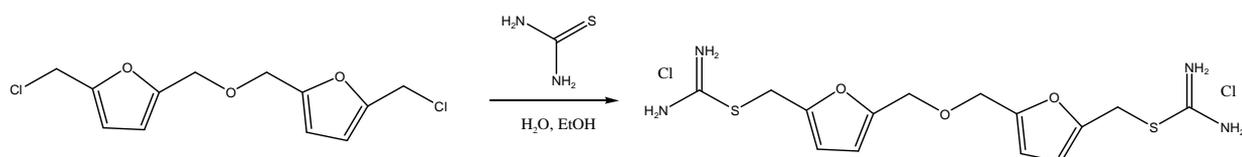
#### 4.4.4.5 – Preparação de 1,3-bis-[2-(S-tioureidometil)-5-furanil]-2-oxa-propano (54)

**Primeira Etapa: Preparação de 1,3-bis-[2-(clorometil)-5-furanil]-2-oxa-propano (50)**



Seguindo-se o procedimento geral descrito no item 4.3.3.3 repetiu-se a primeira etapa com as seguintes quantidades: 50,0 mg (2,1 mmol) de **48**, 1,20 mL (10 mmol) de lutidina e 0,80 mL (10 mmol) de SOCl<sub>2</sub> em 2,5 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi imediatamente utilizada.

**Segunda Etapa: Obtenção de 1,3-bis-[2-(S-tioureidometil)-5-furanil]-2-oxa-propano (54)**



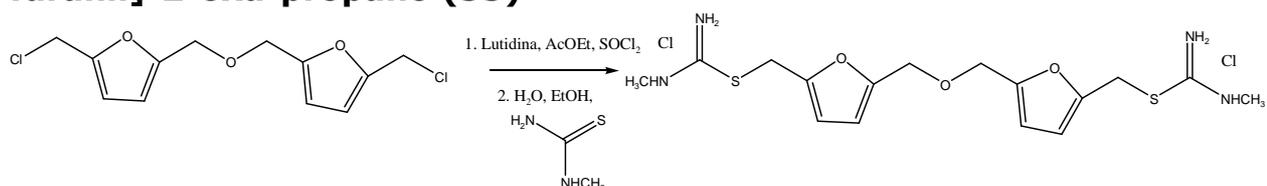
Seguindo-se o procedimento geral descrito no item 4.3.3.3 repetiu-se a segunda etapa com as seguintes quantidades: se 0,65 g (8,60 mmol) de tiourea em 2,00 mL de água e 4,00 mL de etanol. Repetindo-se os mesmos procedimentos de extração, foram obtidos 510 mg (57 %) de um líquido amarelo extremamente viscoso.

**Aspecto físico:** líquido amarelado      **FM:** C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>

**MM:** 427,4 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura CXLVI, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura CXLVII, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura CXLVIII, Anexo II); ESI – MS (Figura CL, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 10**, na página 69 e na **Tabela III do Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### 4.4.4.6 – Preparação de 1,3-bis-[2-((N-metil)-S-tioureido-metil)-5-furanil]-2-oxa-propano (55)



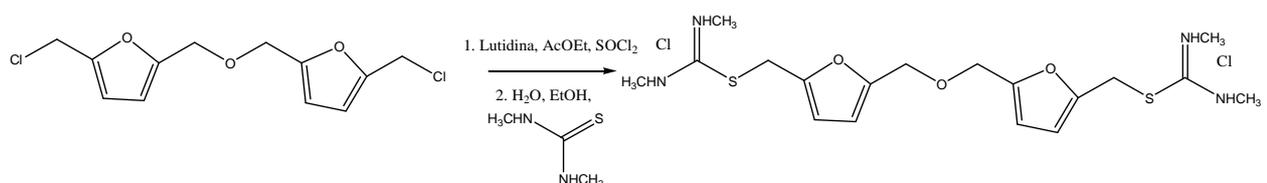
Seguindo-se o procedimento geral descrito no item [4.3.3.3](#) repetiu-se a primeira etapa com as mesmas quantidades. Adicionou-se 0,783g (8,7mmol) de 1-metil-2-tioureia em 3,00 mL de água e 4,00 mL de etanol. Repetindo-se os mesmos procedimentos de reação e extração foram obtidos 900 mg (94%) de um líquido viscoso.

**Aspecto físico:** líquido amarelado      **FM:** C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>

**MM:** 455,4 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura CLI, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura CLII, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura CLIII, Anexo II); ESI – MS (Figura CLV, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 10**, na página 69 e na **Tabela III** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### 4.4.4.7 – Preparação de 1,3-bis-[2-((N,N-dimetil)-S-tioureido-metil)-5-furanil]-2-oxa-propano (56)



Seguindo-se o procedimento geral descrito no item [4.3.3.3](#) repetiu-se a primeira etapa com as mesmas quantidades. Após adição de 0,905g (8,7mmol) de 1,3-dimetil-2-tioureia em 3,00 mL de água e 4,00 mL de etanol e repetindo-se os mesmos procedimentos de reação e extração foram obtidos 585 mg de um líquido viscoso (rendimento de 56 %).

**Aspecto físico:** líquido amarelado      **FM:** C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub>

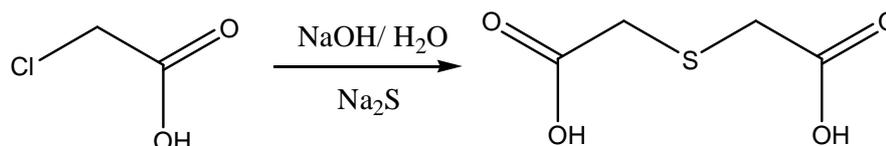
**MM:** 483,5 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura CLVI, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura CLVII, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura CLVIII, Anexo II); ESI – MS (Figura CLX, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela**

**10**, na página 69 e na **Tabela III** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.4.5 - Sínteses de Hidrazidas

##### 4.4.5.1 – Preparação de ácido tioglicólico ou tio-bis-acético (**63**)



Em um balão monotubulado de 100 mL, dotado de agitação magnética, foram adicionados 15 g (160 mmol) de ácido cloro-acético e 20 mL de água, adicionaram-se, lentamente, 35 mL (160 mmol) de solução NaOH (18%) e agitou-se por 20 minutos. Esta mistura foi adicionada lentamente sobre uma mistura contendo 19 g (79 mmol) de sulfeto de sódio nonahidratado em 15 mL de água. A reação foi acompanhada por CCD tendo como eluente acetato de etila em hexano (7:2). Após 28 h de agitação, acidulou-se a mistura com ácido sulfúrico concentrado até pH = 1, o produto foi extraído em éter (3 x 150 mL) e diclorometano (3 x 150 mL), as fases orgânicas foram misturadas, secadas com sulfato de sódio anidro e o solvente foi retirado à pressão reduzida. Foram obtidos 8,85 g de um sólido branco (74 % de rendimento).

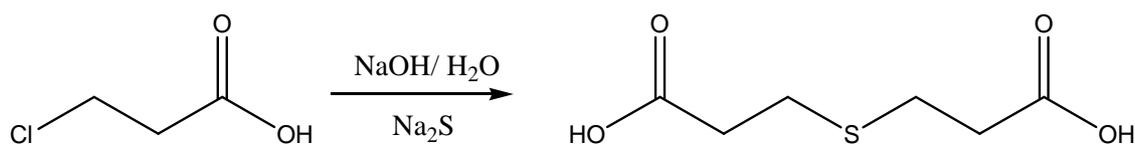
**Aspecto físico:** sólido branco

**PF:** 123,5-126,5 °C **FM:** C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S

**MM:** 150,1 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura CLXI, Anexo II); RMN de  $^1\text{H}$  (Figura CLXII, Anexo II); RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura CLXIII, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 11**, na página 72 e na **Tabela IV** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

##### 4.4.5.2 – Preparação de Ácido tio-dipropiônico (**64**)



Seguindo-se os mesmos procedimentos descritos no item 4.3.4.1 e utilizando-se as seguintes quantidades: 20 g de ácido cloropropiônico (184 mmol), 35 mL de água, 41 mL (184 mmol) de

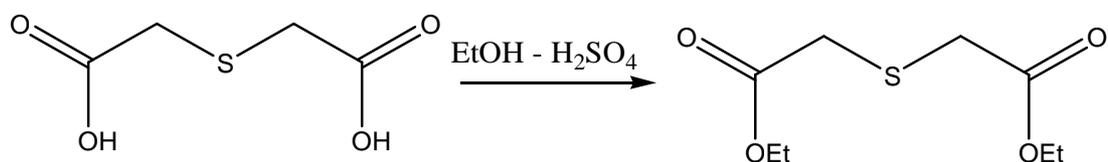
solução de NaOH 18 %, 22,5 g de Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O. Utilizando os mesmos eluentes descritos anteriormente e utilizando os mesmos métodos de elaboração, foram obtidos 12,5 g de um sólido branco (76 % de rendimento).

**Aspecto físico:** sólido branco                      **PF:** 118-120 °C                      **FM:** C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>S

**MM:** 178,2 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura CLXIV, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura CLXV, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura CLXVI, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 11**, na página 72 e na **Tabela IV do Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### 4.4.5.3 – Preparação de dietiléster do ácido tioglicólico (65)



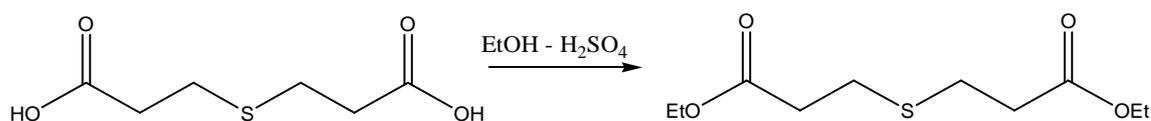
Em um balão monotubulado de 100 mL, acoplado a condensador para refluxo, foram colocados 2,0 g de **63** (13,5 mmol) em 25,0 mL (259 mmol) de etanol anidro (**item 4.2.2**) com 0,756 g (7,7 mmol) de ácido sulfúrico. Aqueceu-se a mistura em potência máxima em micro-ondas modificado com pulsos de 2 em 2 minutos. Acompanhou-se a reação por CCD, após 16 minutos resfriou-se a mistura até 0 °C e adicionou-se 100 mL de éter etílico, adicionou-se 14 mL de solução supersaturada de bicarbonato de sódio, até pH=7. Extraíu-se com 3 x 100mL de éter etílico e secou-se sulfato de sódio anidro, obtendo-se 2,08 g de um óleo levemente amarelado que foi seco em dessecador contendo pentóxido de fósforo (Rendimento de 75%).

**Aspecto físico:** líquido levemente amarelado                      **FM:** C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>S

**MM:** 206,2 g.mol<sup>-1</sup>

**IV (Figura CLXVIII, Anexo II); RMN de <sup>1</sup>H (Figura CLXIX, Anexo II); RMN de <sup>13</sup>C (Figura CLXX, Anexo II):** Os dados encontram-se na **Tabela 11**, na página 72 e na **Tabela IV do Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### 4.4.5.4 – Preparação de dietiléster do ácido tio-bispropionico (66)



Seguindo-se a metodologia descrita em [4.3.4.3](#) reagiram-se 2,21 g (12,4 mmol) de **64** em 25,0 mL de etanol anidro (**item 4.2.2**) com 0,294 g (3,00 mmol) de ácido sulfúrico. Após 26 minutos de reação e extração, obteve-se um óleo amarelado (2,2 g - Rendimento de 70%).

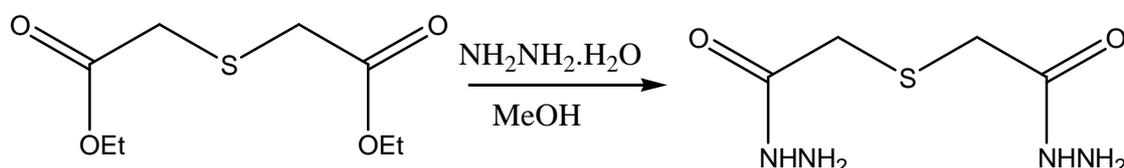
**Aspecto físico:** líquido levemente amarelado

**FM:** C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>S

**MM:** 234,3 g.mol<sup>-1</sup>

**IV** (Figura CLXXII, Anexo II); **RMN de <sup>1</sup>H** (Figura CLXXIII, Anexo II); **RMN de <sup>13</sup>C** (Figura CLXXIV, Anexo II): Os dados encontram-se na **Tabela 11**, na página 72 e na **Tabela IV** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

#### 4.4.5.5 – Preparação de bis-hidrazida do ácido tioglicólico (67) (Dabholkar e Gavande)



Em um balão de 100 mL foram adicionados 1,0 g (4,9 mmol) de **65**, 1,068 mL (17,1 mmol) de hidrato de hidrazina e 50 mL de metanol. Esta mistura foi submetida a sonicação por 37 minutos e a reação foi acompanhada por CCD tendo como eluente metanol, acetato de etila e isopropanol (7:2:1). O solvente foi evaporado até ficar com 1/3 do volume inicial e o produto foi cristalizado por 24 h em geladeira, filtrado e secado. Assim, foram obtidos 726 mg de produto (93 % de rendimento).

**Aspecto físico:** sólido transparente

**PF:** 104-106 °C

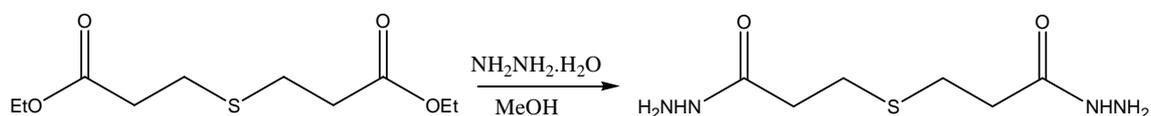
**FM:** C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S

**MM:** 178,2 g.mol<sup>-1</sup>

**IV** (Figura CLXXVI, Anexo II); **RMN de <sup>1</sup>H** (Figura CLXXVII, Anexo II); **RMN de <sup>13</sup>C** (Figura CLXXVIII, Anexo II); **ESI – MS** (Figura CLXXIX, Anexo II): Os dados encontram-

se na **Tabela 11**, na página 72 e na **Tabela IV** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.4.5.6 – Preparação de bis-hidrazida do ácido bis-propiónico (**68**)



Utilizando os mesmos procedimentos descritos no item 4.3.4.7 e os mesmos métodos de purificação, foram usadas as seguintes quantidades: 1,0 g (4,3 mmol) de **66**, 1,068 mL (17,1 mmol) de hidrato de hidrazina, 50 mL de metanol. A mistura foi sonicada por 10 minutos, após semelhante elaboração, foram obtidos 626 mg de sólido transparente (71 %).

**Aspecto físico:** sólido transparente

**PF:** 76,6-79,9 °C

**FM:**  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$

**MM:** 206,3  $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$

**IV** (**Figura CLXXX**, **Anexo II**); **RMN de  $^1\text{H}$**  (**Figura CLXXXI**, **Anexo II**); **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (**Figura CLXXXII**, **Anexo II**); **ESI – MS** (**Figura CLXXXIV**, **Anexo II**): Os dados encontram-se na **Tabela 11**, na página 72 e na **Tabela IV** do **Anexo I** encontram-se os valores comparativos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

## 5 – Resultados e Discussão da Atividade Biológica Investigada

### 5.1 – Estudos de Atividade Antifúngica

Para os estudos de atividade antifúngica dos compostos preparados **1-8** (compostos tetrazólicos e dinitrilas precursoras), **41** (complexo de platina), **67-68** (hidrazidas) utilizou-se o protocolo padronizado CLSI (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) de 2002 e 2008 (Rex *et al.*, 2008), que determina que a concentração inibitória mínima (CIM) é determinada a partir da produção de redução de 80 % das colônias em comparação com o controle. A atividade biológica dos compostos foi avaliada levando-se em conta a menor concentração em que foram detectadas visualmente a redução de 80-100% dos fungos estudados; cabe ressaltar que quanto menor o valor de CIM, maior a atividade farmacológica. As CIMs para colônias de *Candida spp.* (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) e *Sacharomyces cerevisiae* foram determinadas após 24 h e 48 h de inoculação do fungo. Para o teste com *Paracoccidioides brasiliensis* foram feitas leituras de três, cinco e sete dias.

**Tabela 13. CIM dos fármacos utilizados como padrões de comparação**

| Espécie / Composto                                       | <i>C. albicans</i>                  | <i>C. glabrata</i>                    | <i>C. krusei</i>                    | <i>C. parapsilosis</i>                | <i>C. tropicalis</i>       | <i>C. dubliniensis</i>     |
|--|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| AMB ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )<br>( $\text{mol.L}^{-1}$ ) | 0,25<br>( $2,71.10^{-7}$ )          | NI                                    | 1,00<br>( $1,08.10^{-6}$ )          | 0,5<br>( $5,41.10^{-7}$ )             | 1,00<br>( $1,08.10^{-6}$ ) | NC                         |
| FLC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )<br>( $\text{mol.L}^{-1}$ ) | 1,95<br>( $6,37.10^{-6}$ )          | 1,00<br>( $3,27.10^{-6}$ )            | 1,00<br>( $3,27.10^{-6}$ )          | 0,9<br>( $2,94.10^{-6}$ )             | 16<br>( $5,23.10^{-5}$ )   | NC                         |
| Espécie / Composto                                       | <i>P. brasiliensis</i><br><b>01</b> | <i>P. brasiliensis</i><br><b>MG05</b> | <i>P. brasiliensis</i><br><b>18</b> | <i>P. brasiliensis</i><br><b>1017</b> | <i>A. flavus</i>           | <i>A. Clavatus</i>         |
| AMB ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )<br>( $\text{mol.L}^{-1}$ ) | NI                                  | NI                                    | NI                                  | NI                                    | 1,00<br>( $1,08.10^{-6}$ ) | 0,25<br>( $2,71.10^{-7}$ ) |
| FLC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )<br>( $\text{mol.L}^{-1}$ ) | 4<br>( $1,31.10^{-5}$ )             | 8<br>( $2,61.10^{-5}$ )               | 8<br>( $2,61.10^{-5}$ )             | 8<br>( $2,61.10^{-5}$ )               | >128<br>( $4,2.10^{-4}$ )  | >128<br>( $4,2.10^{-4}$ )  |
| Espécie / Composto                                       | <i>A. niger</i>                     | <i>A. fumigatus</i>                   | <i>A. fumigatus</i><br><b>IC</b>    | <i>A. tamarii</i>                     | <i>C. neoformans</i>       | <i>C. gatti</i>            |
| AMB ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )<br>( $\text{mol.L}^{-1}$ ) | 1,00<br>( $1,08.10^{-6}$ )          | 1,00<br>( $1,08.10^{-6}$ )            | 0,25<br>( $2,71.10^{-7}$ )          | 0,25<br>( $2,71.10^{-7}$ )            | NI                         | NI                         |
| FLC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )<br>( $\text{mol.L}^{-1}$ ) | >128<br>( $4,2.10^{-4}$ )           | >128<br>( $4,2.10^{-4}$ )             | >128<br>( $4,2.10^{-4}$ )           | >128<br>( $4,2.10^{-4}$ )             | 1,00<br>( $6,54.10^{-6}$ ) | NI                         |
| Espécie / Composto                                       | <i>S. cerevisiae</i>                | <i>S. schenkii</i>                    |                                     |                                       |                            |                            |
| AMB ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )<br>( $\text{mol.L}^{-1}$ ) | NI                                  | NI                                    |                                     |                                       |                            |                            |
| FLC ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )<br>( $\text{mol.L}^{-1}$ ) | 1,00<br>( $6,54.10^{-6}$ )          | 1,00<br>( $6,54.10^{-6}$ )            |                                     |                                       |                            |                            |

\* NI: não inibe ; AMB: Anfotericina B; FLC: Fluconazol

**Tabela 14. Concentração inibitória mínima (CIM<sub>80-100</sub>) dos compostos 1-8.**

| <b>Composto/<br/>CIM</b>       | <b>1</b>   | <b>2</b>   | <b>3</b>   | <b>4</b>   | <b>5</b>   | <b>6</b>   | <b>7</b>   | <b>8</b>   |
|--------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| <b>Espécie</b>                 | <b>µg.mL<sup>-1</sup><br/>(mol.L<sup>-1</sup>)</b> |
| <i>C. albicans</i>             | 128<br>(9,14.10 <sup>-4</sup> )                    | 128<br>(7,62.10 <sup>-4</sup> )                    | 128<br>(5,66.10 <sup>-4</sup> )                    | 128<br>(5,04.10 <sup>-4</sup> )                    | N.C.   | N.C.   | N.C.   | 128<br>(4,48.10 <sup>-4</sup> )                    |
| <i>C. glabrata</i>             | >256<br>(1,83.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,52.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,13.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(8,95.10 <sup>-4</sup> )                   |
| <i>C. krusei</i>               | 64<br>(4,57.10 <sup>-4</sup> )                     | 128<br>(7,62.10 <sup>-4</sup> )                    | 128<br>(5,66.10 <sup>-4</sup> )                    | 128<br>(5,04.10 <sup>-4</sup> )                    | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | 256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                    | 128<br>(4,48.10 <sup>-4</sup> )                    |
| <i>C. parapsilosis</i>         | 128<br>(9,14.10 <sup>-4</sup> )                    | 128<br>(7,62.10 <sup>-4</sup> )                    | 128<br>(5,66.10 <sup>-4</sup> )                    | 128<br>(5,04.10 <sup>-4</sup> )                    | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                   | 128<br>(4,48.10 <sup>-4</sup> )                    |
| <i>C. tropicalis</i>           | 64<br>(4,57.10 <sup>-4</sup> )                     | 128<br>(7,62.10 <sup>-4</sup> )                    | 64<br>(2,83.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(2,52.10 <sup>-4</sup> )                     | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                   | 64<br>(2,24.10 <sup>-4</sup> )                     |
| <i>C. dubliniensis</i>         | N.C.   | N.C.   | N.C.   | N.C.   | NE   | NE   | NE   | N.C.   |
| <i>P. brasiliensis</i> 01      | 64<br>(4,57.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(3,81.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(2,83.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(2,52.10 <sup>-4</sup> )                     | NE   | NE   | NE   | 64<br>(2,24.10 <sup>-4</sup> )                     |
| <i>P. brasiliensis</i><br>MG05 | 64<br>(4,57.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(3,81.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(2,83.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(2,52.10 <sup>-4</sup> )                     | NE   | NE   | NE   | 64<br>(2,24.10 <sup>-4</sup> )                     |
| <i>P. brasiliensis</i> 18      | 64<br>(4,57.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(3,81.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(2,83.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(2,52.10 <sup>-4</sup> )                     | NE   | NE   | NE   | 64<br>(2,24.10 <sup>-4</sup> )                     |
| <i>P. brasiliensis</i><br>1017 | 64<br>(4,57.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(3,81.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(2,83.10 <sup>-4</sup> )                     | 64<br>(2,52.10 <sup>-4</sup> )                     | NE   | NE   | NE   | 64<br>(2,24.10 <sup>-4</sup> )                     |
| <i>A. flavus</i>               | >256<br>(1,83.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,52.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,13.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(9,48.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(8,95.10 <sup>-4</sup> )                   |
| <i>A. clavatus</i>             | >256<br>(1,83.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,52.10 <sup>-3</sup> )                   | 256<br>(1,13.10 <sup>-3</sup> )                    | 256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                    | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(9,48.10 <sup>-4</sup> )                   | 256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                    | 256<br>(8,95.10 <sup>-4</sup> )                    |
| <i>A. Níger</i>                | >256<br>(1,83.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,52.10 <sup>-3</sup> )                   | 256<br>(1,13.10 <sup>-3</sup> )                    | 256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                    | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(9,48.10 <sup>-4</sup> )                   | 256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                    | 256<br>(8,95.10 <sup>-4</sup> )                    |
| <i>A. fumigatus</i>            | >256<br>(1,83.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,52.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,13.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(9,48.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(8,95.10 <sup>-4</sup> )                   |
| <i>A. fumigatus</i> IC         | >256<br>(1,83.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,52.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,13.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(9,48.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(8,95.10 <sup>-4</sup> )                   |
| <i>A. tamaritii</i>            | >256<br>(1,83.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,52.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,13.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(9,48.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(8,95.10 <sup>-4</sup> )                   |
| <i>C. neoformans</i>           | >256<br>(1,83.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,52.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,13.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | NE   | NE   | NE   | NE   |
| <i>C. Gatti</i>                | >256<br>(1,83.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,52.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,13.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | 128<br>(5,29.10 <sup>-4</sup> )                    | >256<br>(9,48.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(8,95.10 <sup>-4</sup> )                   |
| <i>S. cerevisiae</i>           | >256<br>(1,83.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,52.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,13.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(9,48.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(8,95.10 <sup>-4</sup> )                   |
| <i>S. schenkii</i>             | >256<br>(1,83.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,52.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,13.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,01.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(1,06.10 <sup>-3</sup> )                   | >256<br>(9,48.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(9,92.10 <sup>-4</sup> )                   | >256<br>(8,95.10 <sup>-4</sup> )                   |

\* N.E.=não efetuado ainda, experimentos em andamento, N.C.= Não houve crescimento no controle

Para *Aspergillus spp.* (*A. flavus*, *A. clavatus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. fumigatus clínico*, *A. tamarii*) foi feita uma leitura após 48 h de inoculação do fungo. Para determinação de CIM para *Cryptococcus spp.* (*C. neoformans*, *C. gatti*) foram feitas leituras após 24 h, 48 h e 72 h de inóculo. Finalmente, para leitura de CIM para *Sporotrix schenkii* foram feitas leituras de 3 e de 5 dias. Antes de mais nada mediram-se as CIMs para os antifúngicos usuais considerados como padrões: anfotericina B (AMB) e fluconazol (FLC) (**Tabela 13**). As CIMs para os compostos estudados se encontram em tabelas (**Tabelas 14 e 15**) a seguir sendo que as mesmas foram determinadas sempre no último dia estabelecido pelo protocolo CLSI.

### **5.1.1- Resultados da Avaliação da Atividade Antifúngica (fungistática) de Derivados Tetrazólicos e Precursores**

As dinitrilas **1** e **2**, bem como os derivados bis-tetrazólicos sulfeto e sulfona **3**, **4** e **8**, mostraram-se ativos contra todas espécies de *Candida* exceto *C. glabrata* e também foram ativas contra todos os isolados clínicos de *Paracoccidioides brasiliensis* (**Tabela 14**, na página anterior), pode-se destacar que a própria AMB não apresenta atividade contra este fungo (**Tabela 13**). Os sulfóxidos **5** e **6** não se mostraram ativos contra nenhuma espécie dos fungos com exceção do sulfóxido **5** que se mostrou ativo contra *C. gatti*, sendo que para esta série ele foi o único composto ativo para esta espécie. A sulfona bis-etilênico-tetrazólica **7** somente mostrou atividade contra *C. krusei* e *A. clavatus* e *A. niger*; o derivado sulfona homólogo superior **8** também se mostrou ativo contra *A. clavatus* e *A. niger*. Nenhum dos compostos estudados desta série mostrou-se ativo contra *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. fumigatus IC*, *A. tamarii*, *C. neoformans*, *S. schenkii*.

### **5.1.2- Estudos de Atividade Fungicida de derivados tetrazólicos e precursores dinitrilas**

Com os resultados de atividade fungistática obtidos para os derivados tetrazólicos (**3-8**) e precursores dinitrilas (**1** e **2**) partiu para os ensaios visando avaliar a concentração fungicida mínima dos compostos testados contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, inicialmente. Observou-se que os compostos que já apresentavam resultados mostrando sua atividade fungistática também apresentaram atividade fungicida em concentrações comparáveis ou ligeiramente menores (64-128 µg.L<sup>-1</sup>) (**Tabela 15**).

**Tabela 15. Concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos testados.**

| Espécie /<br>CFM<br>Composto | <i>C. albicans</i><br>$\mu\text{g.mL}^{-1}(\text{mol.L}^{-1})$ | <i>C. krusei</i><br>$\mu\text{g.mL}^{-1}(\text{mol.L}^{-1})$ | <i>C. parapsilosis</i><br>$\mu\text{g. mL}^{-1} (\text{mol.L}^{-1})$ | <i>C. tropicalis</i><br>$\mu\text{g.mL}^{-1}(\text{mol.L}^{-1})$ |
|------------------------------|--|--|--|--|
| <b>1</b>                     | 64 ( $4,57.10^{-4}$ )  | 64 ( $4,57.10^{-4}$ )  | 128 ( $9,14.10^{-4}$ )   | 64 ( $4,57.10^{-4}$ )  |
| <b>2</b>                     | 64 ( $3,81.10^{-4}$ )  | 64 ( $3,81.10^{-4}$ )  | 128 ( $7,62.10^{-4}$ )   | 64 ( $3,81.10^{-4}$ )  |
| <b>3</b>                     | 64 ( $2,83.10^{-4}$ )  | 256 ( $1,13.10^{-3}$ )                                       | 128 ( $5,66.10^{-4}$ )   | 64 ( $2,83.10^{-4}$ )  |
| <b>4</b>                     | 64 ( $2,52.10^{-4}$ )  | 128 ( $5,04.10^{-4}$ )                                       | 128 ( $5,04.10^{-4}$ )   | 64 ( $2,52.10^{-4}$ )  |
| <b>8</b>                     | 64 ( $2,24.10^{-4}$ )  | 128 ( $4,48.10^{-4}$ )                                       | 128 ( $4,48.10^{-4}$ )   | 128 ( $4,48.10^{-4}$ )   |
| AMB                          | 1,95 ( $6,37.10^{-6}$ )  | 1,00 ( $3,27.10^{-6}$ )                                      | 0,90 ( $2,94.10^{-6}$ )  | 16 ( $5,23.10^{-5}$ )  |
| FLC                          | Não é fungicida  |  |  |  |

### 5.1.3 - Resultados da avaliação da atividade antifúngica (fungistática) de derivados tipo hidrazida e complexo de platina

As hidrazidas preparadas mostraram amplo espectro de ação antifúngica, de  $3,1-7,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  (**Tabela 16**) contra todos os fungos que apresentaram crescimento nos ensaios efetuados. É digno de nota, que FLC não apresentou atividade antifúngica frente às espécies *Aspergillus* estudadas (**Tabela 13**), mas as hidrazidas aqui estudadas apresentam atividade frente a este fungo. Porém a AMB ainda mostra uma atividade antifúngica bem mais expressiva contra os fungos testados (escala de  $10^{-6} \text{ M}$ ).

O complexo de platina **41** também apresentou um amplo espectro de ação tendo sido ativo na inibição contra todos os fungos cujas colônias mostraram desenvolvimento. Cabe ressaltar que complexos de platina apresentam atividade anticancerígena bastante difundida na comunidade médico-científica, no entanto, como já mencionado substâncias utilizadas como agentes antitumorais são boas candidatas a agentes antifúngicos, inclusive a própria *cis-Pt* foi investigada como agente inibitório da *C. albicans* (Routh *et al.*, 2011), assim, visando-se um composto de platina que pudesse ser usado como padrão de comparação, também efetuou-se os ensaios antifúngicos com a *cis-Pt* (**Tabela 16**).

**Tabela 16. Atividade antifúngica de hidrazidas e complexos de platina**

| <b>Composto</b><br><b>Espécie</b> | <b>67</b><br><b>µg.mL<sup>-1</sup></b><br><b>(mol.L<sup>-1</sup>)</b> | <b>68</b><br><b>µg.mL<sup>-1</sup></b><br><b>(mol.L<sup>-1</sup>)</b> | <b>41</b><br><b>µg.mL<sup>-1</sup></b> | <b>Cis-pt</b><br><b>µg.mL<sup>-1</sup></b><br><b>(mol.L<sup>-1</sup>)</b> |
|-----------------------------------|---|---|--|---|
| <i>C. glabrata</i>                | 64<br>(3,6.10 <sup>-4</sup> )   | 64<br>(3,1.10 <sup>-4</sup> )   | 64                                     | 64<br>(2,1.10 <sup>-7</sup> )   |
| <i>C. krusei</i>                  | 64<br>(3,6.10 <sup>-4</sup> )   | 64<br>(3,1.10 <sup>-4</sup> )   | 64                                     | 64<br>(2,1.10 <sup>-7</sup> )   |
| <i>C. dubliniensis</i>            | 64<br>(3,6.10 <sup>-4</sup> )   | 64<br>(3,1.10 <sup>-4</sup> )   | 64                                     | 64<br>(2,1.10 <sup>-7</sup> )   |
| <i>C. parapsilosis</i>            | N.C.  | N.C.  | N.C.                                   | N.C.  |
| <i>C. albicans</i>                | 64<br>(3,6.10 <sup>-4</sup> )   | 64<br>(3,1.10 <sup>-4</sup> )   | 64                                     | 64<br>(2,1.10 <sup>-7</sup> )   |
| <i>C. neoformans</i>              | 64<br>(3,6.10 <sup>-4</sup> )   | 64<br>(3,1.10 <sup>-4</sup> )   | 64                                     | 64<br>(2,1.10 <sup>-7</sup> )   |
| <i>C. Gatti</i>                   | 64<br>(3,6.10 <sup>-4</sup> )   | 64<br>(3,1.10 <sup>-4</sup> )   | 64                                     | 64<br>(2,1.10 <sup>-7</sup> )   |
| <i>C. tropicalis</i>              | N.C.  | N.C.  | N.C.                                   | N.C.  |
| <i>Aspergillus (IC*)</i>          | 128<br>(7,2.10 <sup>-4</sup> )  | 128<br>(6,2.10 <sup>-4</sup> )  | 128                                    | 128<br>(4,2.10 <sup>-7</sup> )  |
| <i>A. fumigatus</i>               | 128<br>(7,2.10 <sup>-4</sup> )  | 128<br>(6,2.10 <sup>-4</sup> )  | 128                                    | 128<br>(4,2.10 <sup>-7</sup> )  |
| <i>A. Níger</i>                   | 64<br>(3,6.10 <sup>-4</sup> )   | N.C.  | 64                                     | 64<br>(2,1.10 <sup>-7</sup> )   |
| <i>A. tamaritii</i>               | 64<br>(3,6.10 <sup>-4</sup> )   | 64<br>(3,1.10 <sup>-4</sup> )   | 128                                    | 64<br>(2,1.10 <sup>-7</sup> )   |
| <i>A. clavus</i>                  | 128<br>(7,2.10 <sup>-4</sup> )  | 128<br>(6,2.10 <sup>-4</sup> )  | 128                                    | 128<br>(4,2.10 <sup>-7</sup> )  |

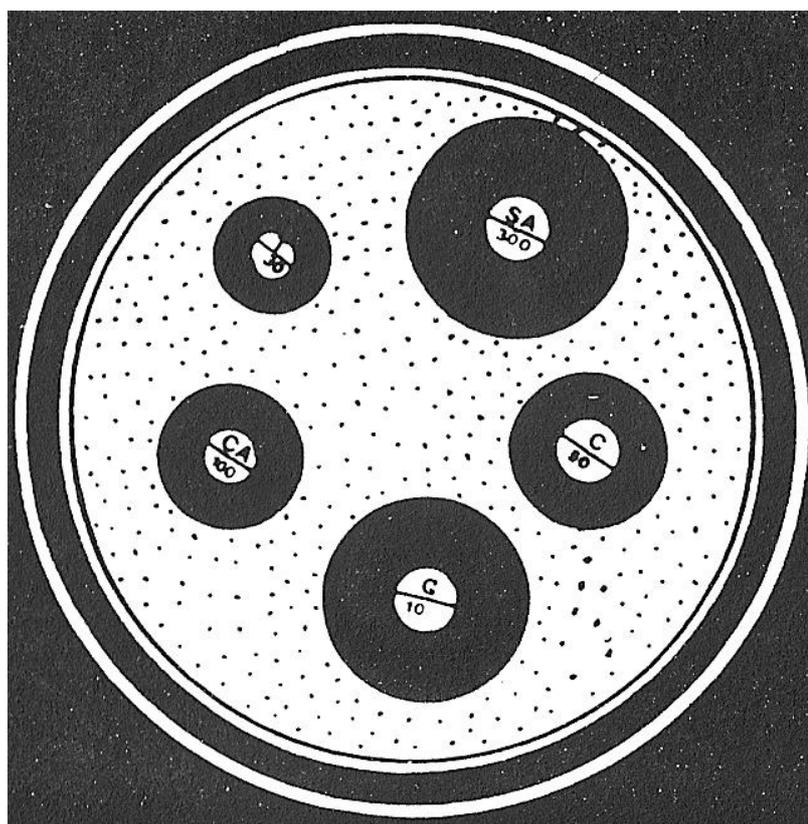
\*IC: Isolado clínico

N.C.: não ocorreu crescimento no controle

## 5.2 – Estudos de Atividade Antibacteriana de derivados tetrazólicos

Para os estudos de atividade antibacteriana dos compostos preparados **1-8** utilizou-se o protocolo padronizado CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (Standards, P.a. 2009). Os compostos foram testados contra: *Pseudomonas aeruginosa* (Gram negativa - ATCC 27853), *Escherichia coli* (Gram negativa - ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (Gram positiva - ATCC 29313) e *S. aureus* multirresistente (MARSA) (Gram positiva - ATCC 33591).

Os diâmetros dos halos foram mensurados considerando-se o diâmetro do disco (**Figura 58**), como padrão de comparação foi utilizado disco de amoxicilina. Os compostos estudados não mostraram halos de inibição contra *E. coli*, *S. aureus* e MARSA, mas os compostos **1-8** mostraram halos sutis contra *P. aeruginosa*, esta espécie de bactéria é encontrada comumente associada com *Candida albicans*, sendo que ambos são organismos patógenos ao homem (McAlester *et al.*, 2008). Os halos de inibição foram medidos e estão na **Tabela 17**.



**Figura 58.** Figura ilustrativa de teste de disco difusão.

**Tabela 17. Halos de inibição para *P. aeruginosa* dos compostos 1-8**

| Composto       | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | Amoxicilina |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|
| Inibição (±mm) | 6,8 | 7,2 | 6,2 | 6,3 | 6,2 | 6,3 | 6,2 | 6,2 | 24,0        |

Assim deu-se continuidade para o teste de CIM dos compostos apenas contra *P. aeruginosa*. A concentração inicial estudada foi de 512 µg.mL<sup>-1</sup> e os compostos não apresentaram CIM até tal concentração, ou seja *P. aeruginosa*, bem como as demais espécies de bactérias estudadas não apresentam susceptibilidade frente aos compostos investigados.

### 5.3 – Estudos de Atividade Anticancerígena de derivados tetrazólicos

Os compostos tetrazólicos (**1-4**, **7** e **8**) e seus precursores dinitrilas (**1-2**) foram submetidos a ensaios farmacológicos para avaliação da atividade citotóxica (ou antitumoral) contra algumas linhagens de células saudáveis (BHK) e de células cancerígenas (carcinoma mamário murino 4T1(M), adenocarcinoma de pulmão A549, melanoma (MEWO) e glioma de rato C6). Os resultados obtidos estão na **Tabela 18**. Quanto à toxicidade, esta foi avaliada em células epitélio de rim de hamster bebê (BHK21). A dinitrila **2** mostrou citotoxicidade contra carcinoma mamário humano e melanoma, apresentando esta atividade mais de cem vezes maior do que a toxicidade contra células saudáveis (BHK). A sulfona **7** e o sulfeto **3** mostraram atividade antitumoral e seletividade similar a **2** somente contra carcinoma mamário e a sulfona **8** foi ainda mais seletiva e mais ativa contra este mesmo tipo de câncer IC<sub>50</sub><10<sup>-7</sup>. O sulfeto bis-tetrazólico **4** também foi o único derivado ativo contra glioma de rato bem como foi ativo para melanoma, mas a sua toxicidade contra células saudáveis é comparável. Cabe ressaltar que os compostos **5** e **6** ainda não foram testados, mas os estudos estão em andamento.

**Tabela 18. Concentrações de atividade *in vitro* linhagens de células BHK, 4T1, A549, MEWO e C6 para os compostos 1-4, 7 e 8.**

| Composto / Linhagem | 1<br>IC <sub>50</sub><br>mol.L <sup>-1</sup> | 2<br>IC <sub>50</sub><br>mol.L <sup>-1</sup> | 3<br>IC <sub>50</sub><br>mol.L <sup>-1</sup> | 4<br>IC <sub>50</sub><br>mol.L <sup>-1</sup> | 7<br>IC <sub>50</sub><br>mol.L <sup>-1</sup> | 8<br>IC <sub>50</sub><br>mol.L <sup>-1</sup> |
|---------------------|--|--|--|--|--|--|
| BHK                 | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | 5,20.10 <sup>-5</sup>                        | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | 9,40.10 <sup>-5</sup>                        |
| 4T1(M)              | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | 4,79.10 <sup>-6</sup>                        | 2,40.10 <sup>-6</sup>                        | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | 8,32.10 <sup>-6</sup>                        | <1,00.10 <sup>-7</sup>                       |
| A549                | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | >10 <sup>-4</sup>                            | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       |
| MEWO                | 2,1.10 <sup>-4</sup>                         | 8,32.10 <sup>-6</sup>                        | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | 2,19.10 <sup>-5</sup>                        | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       |
| C6                  | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | 2,88.10 <sup>-5</sup>                        | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       | >1,00.10 <sup>-4</sup>                       |

## 6 - Parte Experimental – Ensaios Biológicos

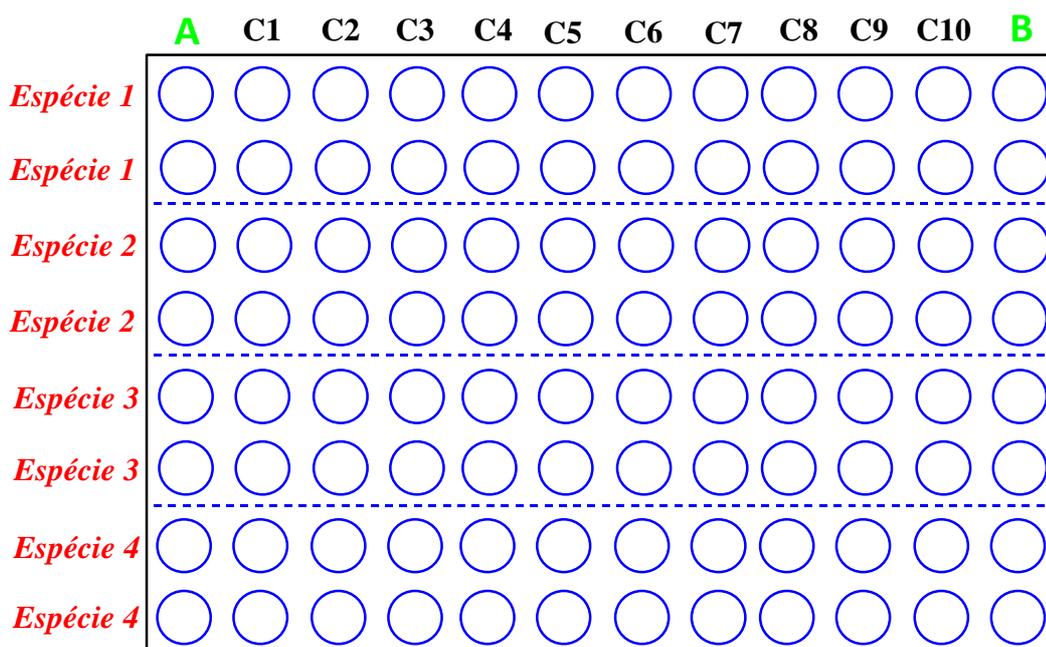
### 6.1 – Estudos de Atividade Antifúngica

#### 6.1.1 – Considerações Gerais

Os testes de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Micologia do Departamento de Micologia no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG), sob coordenação da Professora Maria Aparecida Resende Stoianoff, co-orientadora do trabalho desenvolvido nesta tese. Os testes foram realizados pela autora com a ajuda dos alunos Thaís Magalhães (mestrado) e Luciano José Nogueira (pós-doutorado).

#### 6.1.2 – Procedimentos para Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram utilizadas placas plásticas estéreis de 96 orifícios (**Figura 59**), onde foram adicionados 200 µL de RPMI 1640 em cada orifício da primeira coluna (A), para o controle negativo de crescimento da levedura e controle de esterilidade. Na coluna (B) adicionaram-se 100 µL de RPMI 1640 e 100 µL de inóculo da levedura correspondente ao ensaio, para o controle positivo de crescimento do fungo testado. No momento da leitura, o crescimento de microorganismos no controle positivo (poço B), mostra a viabilidade da cultura usada e seu crescimento é comparado visualmente, ao crescimento verificado nos poços referentes às diferentes concentrações testadas (poço número 1 até 10). No controle negativo (poço A), pela ausência de inóculo não pode haver crescimento de outros microorganismos, garantindo a não contaminação durante o experimento.

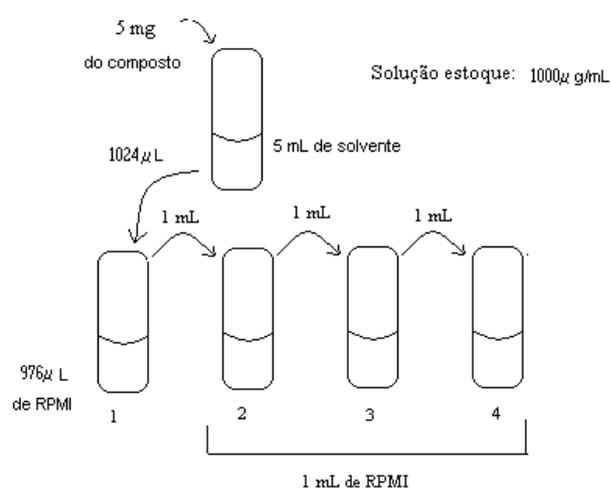


**Figura 59. Placa de Elisa de 96 orifícios: Distribuição das concentrações de duas substâncias e quatro espécies de fungos testadas por placa.**

Fizeram-se duplicatas das concentrações para os compostos sintetizados e os antifúngicos utilizados e como controles foram utilizadas as seguintes substâncias: Anfotericina B (AMB) e Fluconazol (FLC). Nas colunas correspondentes às concentrações testadas de composto, com uma pipeta de microdiluição de 12 canais (utilizando apenas 10 canais), foram distribuídos em cada orifício 100  $\mu\text{L}$  do inóculo correspondente. Na preparação de cada microorganismo, utilizou-se, inicialmente, uma diluição em solução salina esterilizada, e depois diluição em RPMI-1640. Esta preparação da solução de inóculo é realizada para se obter o dobro da concentração final desejada, visto que esta será posteriormente adicionada à igual volume da solução contendo o composto a ser examinado.

Em seguida, foram adicionados, em cada orifício, 100  $\mu\text{L}$  do composto na coluna correspondente a sua concentração, resultando, com diluição do composto num total de 200  $\mu\text{L}$ , em uma concentração final de que varia de 256 a 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A placa foi selada com um papel filme, incubada a 35  $^{\circ}\text{C}$  pelo tempo estabelecido para cada espécie e a leitura feita visualmente. As CIMs foram consideradas como a menor concentração do composto testado ou antifúngico que inibiu 80-100% o crescimento do microorganismo, em relação ao controle de crescimento após a incubação e foram expressas em  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e  $\text{mol}.\text{L}^{-1}$ .

Os compostos sintetizados testados foram dissolvidos em água destilada estéril ou dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo soluções estoque (concentração de  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Com o uso de quatro tubos falcons estéreis com tampa, transferiu usando um pipetador de  $1000 \mu\text{L}$ , o RPMI 1640 para os falcons. Fez-se uma diluição seriada de todos os compostos testados, transferindo-se o volume calculado previamente da solução estoque do composto correspondente ( $1024 \mu\text{L}$  de solução estoque em  $976 \mu\text{L}$  de RPMI) para o primeiro falcon, resultando na primeira solução com concentração de  $512 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Desta primeira diluição, foi transferido  $1,0 \text{ mL}$  da primeira solução para o para o segundo falcon que já continha  $1,0 \text{ mL}$  de RPMI, resultando a segunda solução e, assim, sucessivamente, até a quarta solução (**Figura 60**). Assim, os compostos foram testados em dez concentrações que variaram de  $256$  a  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 60. Demonstração da diluição seriada dos compostos testados.**

Para obtenção das soluções padrão, com antifúngicos usados clinicamente, apagou-se a luz, devido ao fato de a AMB ser foto instável, e procedeu-se com a mesma metodologia descrita acima, mas resultando em 10 concentrações previamente calculadas e de acordo com a literatura. O mesmo procedimento foi realizado para o FLC com a luz acesa.

### **6.1.3- Meio de Cultura**

Na manutenção das culturas fúngicas e no preparo dos inóculos para determinação das CIMs foram utilizados:

- Caldo de Agar Sabouraud Dextrose (ASD – Oxoid, Basingstoke, UK) foi utilizado para os ensaios com a maioria dos inóculos;
- Meio RPMI 1640 (Sigma) para *Sporothrix schenckii* foi suplementado com 5 % de dextrose;
- O meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute, tamponado para pH 7,0 com ácido-2-(N-morfolino)-propanosulfônico (MOPS),  $0,165 \text{ molL}^{-1}$  (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) foi utilizado na execução da determinação da CIM para todas espécies;
- As amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* foram mantidas em meio sólido Fava-Netto e incubadas a 37 °C para se obter a fase de levedura. Foram realizados repiques semanais com o objetivo de manter as amostras viáveis;
- O meio Agar Batata Dextrose (BDA – Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) foi utilizado para obtenção dos esporos utilizados no inóculo do gênero *Aspergillus*.

#### **6.1.4- Origem dos Microrganismos**

Todos os microorganismos são pertencentes à Coleção de Microorganismos do Laboratório de Micologia/Departamento de Microbiologia da UFMG. Os microorganismos utilizados nos ensaios para determinação das CIMs são Microorganismos ATCC (“*American Type Culture Collection*” – ATCC): *Candida albicans* – ATCC 18804; *Candida glabrata* – ATCC 2001; *Candida krusei* – ATCC 200298; *Candida parapsilosis* – ATCC 22019; *Candida tropicalis* – ATCC 22019; *Aspergillus fumigatus* – ATCC 16913; *Aspergillus flavus* – ATCC 36612; *Cryptococcus neoformans* – ATCC 32608; *Sporothrix schenckii* – ATCC 10212. Foram também utilizados os seguintes microrganismos isolados clinicamente (IC): *Candida dubliniensis* (CD28); *Aspergillus clavatus*; *Aspergillus fumigatus*; *Aspergillus tamarii*; *Aspergillus niger*; *Paracoccidioides brasiliensis* (MG05, PB01, PB18, PB1017); *Cryptococcus gatti*.

#### **6.1.5- Preparação do Inóculo**

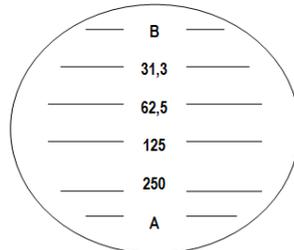
As preparações dos inóculos e também condições da determinação da CIM foram realizadas seguindo documento M27 para fungos leveduriformes e M38 para fungos filamentosos todos de acordo com as normas internacionais estabelecidas pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)(Rex et al., 2008; Jorgensen e Ferraro, 2009).

As espécies foram subcultivadas em meio específico ASD/BDA, sendo mantidas em tempos específicos e temperaturas específicas (NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*). Preparou-se uma suspensão, usando-se um tubo falcon grande estéril,

contendo 5 mL de solução salina estéril 0,85%, e transferiu-se para esse falcon a cultura, com auxílio de uma alça estéril. Ajustou-se a concentração desta suspensão salina com o espectrofotômetro (modelo Micronal B542) a 520 nm, até obter transmitância específica. O inóculo de cada levedura foi preparado transferindo-se 300 µL da suspensão salina da levedura correspondente, para um falcon estéril grande com 14,7 mL de RPMI 1640, obtendo-se uma suspensão de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$  ufc/mL (Chan, 2002). Para diferentes volumes finais de suspensão, dependendo das espécies de cada ensaio e da quantidade de compostos testados, efetuou-se procedimento similar sendo calculados os volumes proporcionais ao descrito acima.

### 6.1.6- Estudo da Atividade Fungicida

Após determinação da CIM, 10 µL das soluções inoculadas presentes na placa de elisa (as mesmas onde foram determinadas CIMs) foram transferidas com o auxílio de uma pipeta de microdiluuição multicanal para uma placa de petri contendo ASD (**Figura 61**). Foram aguardados cerca de 15 minutos até que o RPMI do subcultivo evaporasse e levou-se a placa à estufa de 35°C com a finalidade de determinar a concentração fungicida mínima (CFM ) após 24 h de cultivo.



**Figura 61. Placa de petri subcultivada em duplicata para diferentes concentrações em µg/mL, A, controle de esterilidade (negativo) e B é o controle de crescimento (positivo).**

## 6.2 – Estudos de Atividade Antibacteriana

### 6.2.1- Considerações Gerais

Os testes de atividade antibacteriana foram realizados pela autora desta tese no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Micologia no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG), sobre coordenação da Professora Maria Auxiliadora Roque de Carvalho e auxílio da estudante de mestrado Simone Cristina Coutinho.

### **6.2.2- Aparelhos Utilizados**

Purificador de água Milli-Q Plus (Millipore); Balança analítica Micronal AB 204.

### **6.2.3- Origem das Linhagens e Meio de Cultura**

Os microorganismos utilizados nos ensaios para o teste de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão são Microorganismos ATCC (*American Type Culture Collection* (ATCC): *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29313), *Staphylococcus aureus* multirresistente, MARSA (ATCC 33591), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

### **6.2.4- Materiais**

Os materiais utilizados para os experimentos foram: Ágar Müller-Hinton pH entre 7,2 e 7,4 a temperatura ambiente após solidificação; placas de petri caldo Müller-Hinton; salina 0,85%; tubos falcons; ponteiras (1000 mL e 100mL); pinças estéreis; Swab.

### **6.2.5- Procedimentos para teste de susceptibilidade em disco-difusão**

As bactérias foram descongeladas e incubadas em placa de elisa por 18 h. Após este tempo foi realizado o teste de Gram, após o teste as mesmas foram incubadas em caldo Müller-Hinton por 18 h. Regulou-se a concentração de bactérias pela escala de Mc Farland (0,5). Fez-se soluções aquosas contendo  $256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cada composto a ser testado e também do solvente Tween 20.

Primeiramente foi efetuado um teste de potencialidade bactericida em placa de petri denominado Disco-difusão. Para tal teste foram feitas soluções aquosas dos compostos **3-8** e solução em TWEN 20 com os compostos **1-2** na concentração de  $256 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 10  $\mu\text{L}$  destas foram colocados sobre discos na placa de elisa já contendo cada bactéria a ser estudada em Agar de Müeler Hinton. Molhou-se o Swab na cultura de bactérias e estriou-se na placa de petri. Aplicou-se discos com o auxílio de pinças sobre o biofilme e, sobre cada um deles, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de solução de cada composto, a cultura foi submetida à incubação por 18 h.

## 6.2.6- Procedimentos para determinação da concentração inibitória mínima

Para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram utilizadas placas elisa estéreis de 96 orifícios (**Figura 62**), onde foram adicionados 200 µL de caldo Müller-Hinton em cada orifício das colunas 6 e 12, para o controle negativo de crescimento da levedura e controle de esterilidade. Nas colunas 5 e 11 foram adicionados 190 µL de caldo Müller-Hinton e 10 µL de inóculo de bactéria correspondente ao ensaio, para o controle positivo de crescimento da bactéria. No momento da leitura, o crescimento de microrganismos no controle positivo (poço 6 ou 12), mostra a viabilidade da cultura usada e seu crescimento é comparado visualmente, ao crescimento verificado nos poços referentes às diferentes concentrações testadas (poço número 2 até 5, para substância 1 ou poço número 8 até 11, para substância 2). No controle negativo (poços 1 e 7), pela ausência de inóculo não pode haver crescimento de microrganismos contaminantes.

|   | 1   | 2   | 3   | 4  | 5     | 6     | 7   | 8   | 9   | 10 | 11    | 12    |
|---|-----|-----|-----|----|-------|-------|-----|-----|-----|----|-------|-------|
| A | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - |
| B | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - |
| C |     |     |     |    |       |       |     |     |     |    |       |       |
| D | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - |
| E | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - |
| F |     |     |     |    |       |       |     |     |     |    |       |       |
| G | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - |
| H | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - | 512 | 256 | 128 | 64 | CII + | CII - |

**Figura 62. Modelo da placa de Petri de 96 orifícios utilizada para determinação CIM das substâncias sintetizadas.**

Preparou-se as soluções de maneira similar à feita para CIM para fungos, foram distribuídos 100 µL das soluções contendo respectivamente 1024 µg.L<sup>-1</sup>, 512 µg.L<sup>-1</sup>, 256 µg.L<sup>-1</sup> e 128 µg.L<sup>-1</sup> de cada composto diluído em caldo Müller-Hinton, a cultura de *P.aeruginosa* contendo >2.10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> foi inoculada e incubada a 37 °C por 24 h.

## **6.3 – Estudos de Atividade Anticancerígena**

### **6.3.1- Considerações Gerais**

Os testes de citotoxicidade foram realizados pelos estudantes de doutorado Ana Cândida Araújo e Silva, Dalton Dittz Júnior e Kátia Michelle Freitas no Laboratório de Substâncias Antitumorais do Departamento de Farmacologia no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (ICB-UFMG), sobre coordenação da Professora Miriam Teresa Paz Lopes. A autora desta tese apenas acompanhou alguns procedimentos.

### **6.3.2- Aparelhos Utilizados**

Estufa de CO<sub>2</sub> (Sanyo); Fluxo laminar (Veco); Leitor de Elisa Biorad modelo 2550; Microscópio óptico (Olympus CK 2); Aparelho ultra-som Thornton T14; Purificador de água Milli-Q Plus (Millipore); Balança analítica Micronal AB 204.

### **6.3.3- Origem das Linhagens e Meio de Cultura Celular**

A linhagem celular derivadas de melanoma humano (MeWo) foi cedidas pelo Dr. Ricardo R. Bretani do Instituto Ludwig de pesquisa sobre o câncer, de São Paulo. A linhagem carcinoma de pulmão humano (A549) foi cedida pela professora Mônica Cristina de Oliveira da Faculdade de Farmácia da UFMG. As demais linhagens: e epitélio de rim de hamster (BHK21) e glioma de rato (C6) são pertencentes à Coleção do Laboratório de Substâncias Antitumorais do Departamento de Bioquímica da UFMG. A linhagem celular 4T1(M) de carcinoma mamário murino é pertencente ATCC: 4T1(M)ATCC-CRL-2539.

Para o meio de cultura, tem em cada 1,0 L de meio: 10,4 g de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) em água deionizada; 1,2 g de bicarbonato de sódio (Grupo Química Indústria Ltda.); 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de HEPES pH 7,4 (INLAB); 0,1 g de Ampicilina (Wyeth); 0,1 g de Estreptomicina (Sigma-Aldrich); 0,05 g de Gentamicina (Farmácia HC – FMUSP); 0,0025 g de Anfotericina B (Bristol – Myers Squibb). O meio foi filtrado através de membranas de 0,2  $\mu$  de porosidade (Micro Filtration Systems) garantindo sua esterilização. O Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab) foi

Inativado a 56 °C por 30 minutos e esterilizado por filtração através de membranas de 0,2 µm de porosidade (Micro Filtration Systems).

### **6.3.4- Ensaios Colorimétricos**

Para a medida do crescimento e da viabilidade celular, há três alternativas de ensaios *in vitro*, consideradas pelo NCI (National Câncer Institute) (Boyd, 1989; Bellamy, 1992). Duas consistem em ensaios de metabolismo celular, onde sais de tetrazólio (MTT e XTT) são reduzidos a produtos coloridos. Nestes ensaios colorimétricos, a viabilidade celular é avaliada por meio de uma reação biológica catalisada por desidrogenases. Em células viáveis, essas enzimas estão ativas e têm a capacidade de reduzir o sal de tetrazólio à formazana, um produto colorido. Os cristais de formazana, de cor roxa, que se formam com a metabolização do MTT são insolúveis em meio aquoso, e devem ser solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), antes da leitura (**Figura 63**) (Bellamy, 1992). No entanto a metabolização do XTT produz cristais de formazana, de cor laranja, que são solúveis em água, dispensando a etapa de solubilização, o que torna o ensaio mais simples e rápido. Por outro lado, há relatos que várias linhagens celulares tumorais metabolizam o XTT de forma menos eficiente que o MTT e, por isso, esse último ainda é preferido (Scudiero *et al.*, 1988). A absorbância dos produtos formazanas, medida espectrofotometricamente, é diretamente correlacionada com o número de células ativas metabolicamente. Sendo assim, valores de absorbância altos indicam uma elevada produção de formazana (roxo ou laranja), o que significa, em outras palavras, uma alta atividade enzimática e, portanto, presença de um grande número de células viáveis.

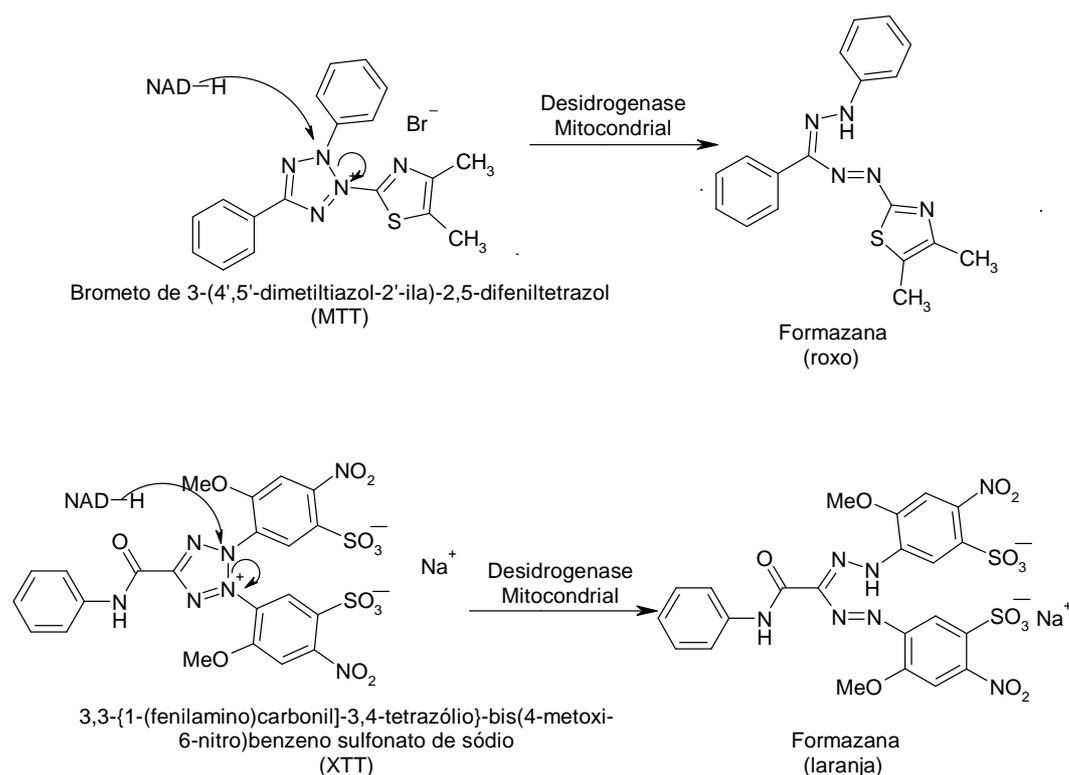


Figura 63. Redução do MTT e do XTT a formazana.

### 6.3.5- Procedimentos Gerais

As células foram cultivadas, rotineiramente, em meio RPMI 1640 a 5 % v/v de soro fetal bovino (SFB) e incubadas em atmosfera úmida com 2,5 % de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37 °C, no escuro. Antes de atingirem confluência as células foram subcultivadas da seguinte maneira: as células foram lavadas com PBS-EDTA, adicionou-se uma solução de tripsina 0,2 %, após o descolamento das células da superfície da garrafa, foi feita a inativação da tripsina pela adição de meio RPMI 1640 a 5 % v/v de SFB. As células em suspensão foram distribuídas para novas garrafas ou placas nas densidades desejadas ou ainda estocadas em nitrogênio líquido (na presença de 10 % de DMSO e 30 % de SFB).

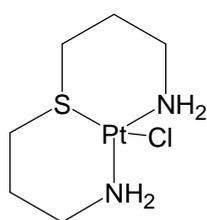
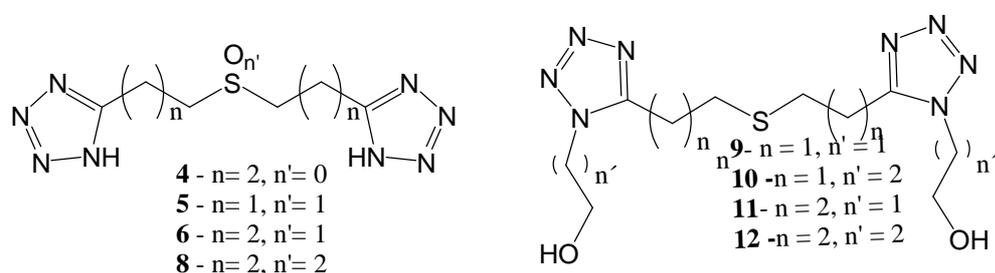
Suspensões celulares foram distribuídas em micro placas de 96 cavidades contendo 1,0 x 10<sup>3</sup> células/poço. As culturas foram incubadas em atmosfera úmida a 5 % de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. Após 48 h foram adicionados os compostos, dissolvidos em DMSO, nas concentrações de 10<sup>-7</sup> à 10<sup>-4</sup> mol/mL. O DMSO utilizado foi 1 % e este não afetou a metabolização celular na concentração utilizada. O MTT foi adicionado 4 h antes das leituras (0,05 mg/cavidade), sendo

estas realizadas cinco dias após a adição dos compostos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Leitor de Elisa), a 600 nm. Antes da adição do MTT, o meio RPMI 1640 a 5 % de v/v de soro fetal bovino (SFB) foi trocado para se evitar qualquer interação entre os compostos analisados e o MTT. Os cristais de formazana formados, devido à metabolização do MTT, são insolúveis em meio aquoso, e por isso foram solubilizados em 150 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), antes das leituras.

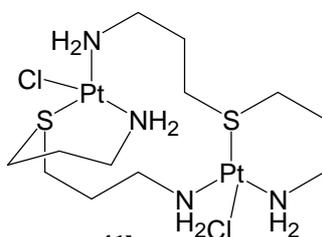
Para controle positivo dos ensaios, não se utilizou nenhum antineoplásico. Em cada micro placa de 96 poços, o branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, foi apenas com meio RPMI 1640 a 5 % v/v de SFB e MTT. O crescimento celular foi acompanhado pelo controle negativo, composto apenas de células em meio RPMI 1640 a 5 % v/v de SFB. As médias aritméticas das densidades ópticas (absorbância) obtidas para os controles foram consideradas como 100 % de viabilidade celular, sendo assim, as porcentagens de células viáveis foram calculadas pela fórmula:  $B/A \times 100$ , onde A= média aritmética da densidade óptica do controle e B= densidade óptica na presença de amostra. A porcentagem de inibição da viabilidade celular foi determinada subtraindo-se de 100 % o valor.

## 7 – Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho, das 67 substâncias propostas, quarenta delas foram sintetizadas, por rotas clássicas, a saber: dois derivados dinitrila (**1-2**), dez derivados tetrazólicos (**3-12**), quatro bis-ftalimidas (**35-38**), quatro diaminas (**21, 23, 39 e 40**), três di-haletos de alquila (**31, 33 e 34**), um complexo de platina, dez derivados furânicos (**46-51, 53-56**), quatro derivados carboxílicos intermediários (carbóxi, **63 e 64** e carbetóxi, **65 e 66**) e duas hidrazidas (**67 e 68**); dentre estas substâncias 14 são inéditas na literatura (**4-6, 8-12** (sendo que os compostos **9-12** são mistura de isômeros), **41** (provavelmente uma mistura de complexos), **51, 53-56**).

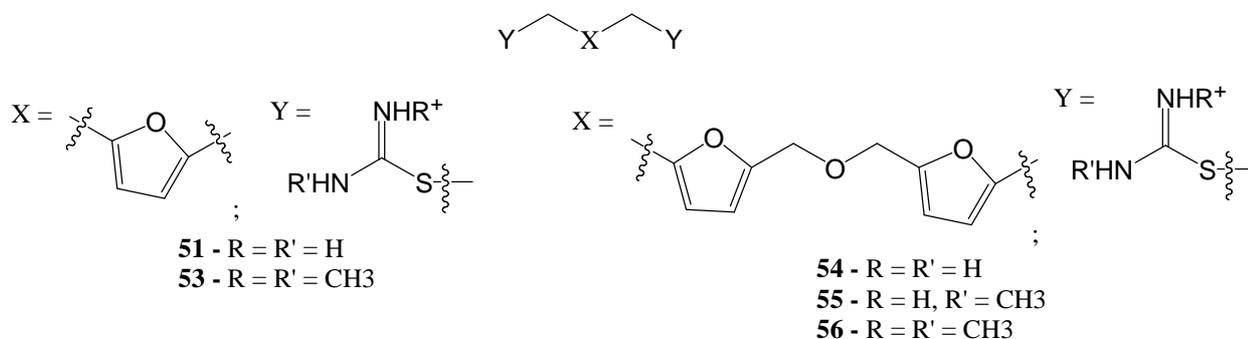


**41a**



**41b**

Estrutura Geral dos compostos **51-56**:



**Figura 64. Estrutura dos compostos inéditos preparados.**

Relativamente aos métodos sintéticos utilizados para preparação de derivados  $\alpha,\omega$ -bisfuncionalizados, pode-se concluir que: i) a preparação das dinitrilas de partida foi possível para a obtenção dos sulfetos dinitrila (**1,2**), pois passava pela alquilação de sulfeto de sódio com  $\omega$ -cloro-alquilnitrilas correspondentes, contudo, a preparação do derivado dinitrila-éter funcionalizados (**29**) a partir de  $\alpha,\omega$ -di-haletos correspondentes não foi eficiente, pois sempre se recuperava o di-haleto de partida, a obtenção deste derivado e de outro análogo (**30**) talvez somente seja possível na presença de éter-coroa; ii) a rota escolhida para a formação de sistemas  $\alpha,\omega$ -bis-tetrazólicos (**3-8**) é satisfatória, porém a formação dos derivados alquilados correspondentes conduz a formação de misturas de isômeros *N*-alquilados (**9-12**) não passíveis de separação até o momento, como também descrito na literatura, o que impossibilitou a preparação dos correspondentes derivados clorados (**13-16**) e tioureido-substituídos (**17-20**); iii) a rota sintética usada para obtenção das  $\alpha,\omega$ -diaminas envolvendo a redução de dinitrilas (**1** e **2**) análogas (com uso de  $\text{Co}_2\text{B}$ ,  $\text{NaBH}_4$  com ácido trifluoracético,  $\text{NaBH}_4$  com  $\text{AlCl}_3$  em diglima) não produziram diaminas como esperado, embora a preparação do sulfeto diamina **21** tenha sido relatada com o uso de  $\text{NaBH}_4$  com ácido trifluoracético (Taki *et al.*, 2008), além do mais, não se obteve a amina **22** a partir da dinitrila **2** por estas reduções; assim como estas reduções não foram eficazes, as dinitrilas **27**, **28**, **29** e **30** não foram preparadas e assim também não se obteve as diaminas correspondentes às três últimas dinitrilas citadas **24**, **25** e **26** iv) a rota sintética para as  $\alpha,\omega$ -diaminas via síntese de Gabriel mostrou-se mais eficaz, gerando as diaminas **21**, **23**, **39** e **40** em bons rendimentos apesar do longo tempo reacional; v) as reações de complexação das  $\alpha,\omega$ -diaminas com platina ( $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ ) mostraram-se satisfatórias somente para o derivado sulfeto-amina com a obtenção da mistura de complexos **41a** e **41b**. Para outros substratos a reação foi de difícil execução gerando produtos de oxidação de platina e estas sínteses merecem ser revisitadas para otimização de novas metodologias para obtenção dos complexos **42-44**; vi) a rota sintética para obtenção dos derivados tetrahydrofurânicos (**57-62**), partindo-se da hidrogenação dos análogos furânicos (**51-56**) não foi eficiente e, além do mais, revelou a instabilidade tanto destes produtos hidrogenados como de seus precursores heteroaromáticos, mostrando a dificuldade de manipulação destes produtos como possíveis fármacos; vii) a rota de preparação das hidrazidas (**67-68**) a partir dos correspondentes análogos carboxílicos (**63-64**) foi a mais simples, prática, eficiente e rápida.

Todos os precursores, intermediários e produtos finais foram devidamente caracterizados através das técnicas usuais de caracterização espectrométrica (IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , ESI-MS) e físico-química (determinação de ponto de fusão e Análise Elementar, quando necessária). Dentre as técnicas espectrométricas utilizadas ESI-MS foi a mais destacável para a caracterização dos sistemas tetrazólicos **3-8**, pois tal estudo detalhado gerou artigo científico em revista, de alto impacto, especializada na área correspondente (Oliveira *et al.*, 2012). Neste artigo demonstra-se que esta técnica espectrométrica é importante não só para caracterização

de sistemas tetrazólicos como também para a investigação de compostos organossulfurados com diferentes estados de oxidação no átomo de enxofre, pois cada um destes grupos funcionais apresenta um padrão de fragmentação diferente que pode ser inclusive simulado por técnicas computacionais específicas.

Dentre os derivados tetrazólicos investigados **3-8** e seus precursores dinitrilas **1-2**, cabe ressaltar, quanto aos estudos de atividade antifúngica e antitumoral, que: viii) as dinitrilas **1** e **2**, bem como os derivados sulfetos-bis-tetrazóis **3** e **4**, mostraram amplo espectro de ação contra todas as cepas clínicas isoladas de *Paracoccidiodides brasiliensis*, bem como contra todas as espécies de *Candida* estudadas, exceto *C. glabrata*, cabendo ressaltar que AMB, um antifúngico padrão na clínica médica, não se mostra ativa contra *P. brasiliensis*; o sulfóxido **5** foi o único produto que foi ativo contra *Cryptococcus gatii*, as sulfonas **7** e **8** foram ativas contra *C. krusei*, *Aspergillus clavatus* e *A.niger*, sendo que a sulfona **8** ainda é ativa contra *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicallis* e todos os isolados de *P. brasiliensis* ; ix) a dinitrila **2** , bem como os bis-tetrazóis **3** (sulfeto), **7** e **8** (sulfonas) tiveram atividade contra câncer mamário murino (4T1), dentre estes destaca-se a atividade de **8** ( $<10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>), estes três derivados mostraram baixa toxicidade frente a células saudáveis; os derivados **1**, **2** e **4** (sulfeto) foram ativos contra células de melanoma, sendo que este último foi o único que apresentou atividade contra glioma de rato (C6); nenhum dos tetrazóis ou nitrilas foram ativos contra câncer de pulmão (A549); x) os tetrazóis e precursores nitrilas **1-8** somente mostraram halos sutis no teste de difusão em ágar frente a *Pseudomonas aeruginosa*, porém o CIM foi maior que 512 µ.L<sup>-1</sup>, evidenciando a não susceptibilidade desta bactéria aos compostos estudados, estes compostos também foram inativos contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* multirresistente (MARSA).

As hidrazidas sintetizadas **67** e **68**, que são compostos de estrutura simples e de fácil obtenção, tiveram somente a atividade antifúngica investigada. Assim, ambas as hidrazidas foram ativas frente a todas as espécies de *Aspergillus*, de *Cryptococcus* e de *Candida* estudadas que cresceram no controle, destacando-se a atividade contra *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. krusei* que são as espécies menos suscetíveis aos fármacos usuais.

É digno de destaque que todas as espécies de *Candida* foram suscetíveis à ação antifúngica dos compostos estudados, o que ressalta a potencialidade destes com novas entidades químicas bioativas como possíveis compostos líderes para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos mais eficientes e menos tóxicos.

No que tange a avaliação de atividade antitumoral até o momento mostra que os compostos estudados são ativos e seletivos a algumas linhagens de câncer, no entanto em concentrações muito altas: da ordem de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>. Pode-se concluir parcialmente, pelas convenções atuais, que estes não podem ser considerados candidatos como agentes

antineoplásicos, exceto o composto **8** que apresentou notável atividade contra células de câncer mamário e baixa toxicidade frente a células saudáveis.

Ao final deste texto, pode-se dizer que estes compostos investigados se mostraram como possíveis novas entidades químicas bioativas, principalmente para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos de alta eficiência e de baixa toxicidade para enfrentar o grave problema de saúde pública das doenças infecciosas emergentes (DIEs) e infecções fúngicas invasivas (IFIs) principalmente nos casos das infecções relacionadas a multirresistência aos antifúngicos clínicos usuais.

Finalmente, como perspectivas futuras e imediatas deste trabalho têm-se:

- O estudo da síntese e da atividade antifúngica e antitumoral de novos derivados similares às nitrilas e aos sistemas tetrazólicos, tais como os derivados bioisostéricos tipo éter e amino  $\alpha,\omega$ -di-nitrilas e  $\alpha,\omega$ -bis-tetrazólicos;
- O estudo da síntese e da atividade antitumoral e antifúngica de complexos de platina com os derivados bioisostéricos  $\alpha,\omega$ -diamina éter, amino, sulfóxido e sulfona;
- O estudo da síntese e da atividade antitumoral e antifúngica de novos derivados bioisostéricos  $\alpha,\omega$ -di-hidrazidas:  $\alpha,\omega$ -diamina éter, amino, sulfóxido e sulfona;
- O estudo da síntese e da atividade antitumoral de novos derivados  $\alpha,\omega$ -dissubstituídos com grupos funcionais bioisostéricos às hidrazinas, tais como hidroxilamina, ureia, oxadiazol e guanidina;
- O estudo do mecanismo de ação por ensaios bioquímicos específicos está sendo desenvolvido em colaboração com o laboratório de Substâncias Antitumorais que é coordenado pela professora Míriam Tereza Lopes;
- O estudo global dos dados de atividade farmacológica por técnicas computacionais e metodologias de QSAR para o estabelecimento definitivo de critérios de efeito da estrutura sobre a atividade e proposição de novos derivados que sejam ainda mais promissores como novas entidades químicas bioativas.

## 8 - Referências Bibliográficas

- Almeida, V. L. (2011). Estudos de QSAR de furanobenzoamidinas frente a *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Síntese de análogos furânicos S-tioureidos. Departamento de Química. Belo Horizonte, Minas Gerais. **Doutorado**.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga e T. M. Hagen (1993). "Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(17): 7915-7922.
- Andrade, C. K. Z. e W. A. Silva (2006). "One-step reduction of chalcones to saturated alcohols by ammonium formate/palladium on carbon: A versatile method." Letters in Organic Chemistry **3**(1): 39-41.
- Arndt, C. A., T. J. Walsh, C. L. McCully, F. M. Balis, P. A. Pizzo e D. G. Poplack (1988). "Fluconazole penetration into cerebrospinal fluid: implications for treating fungal infections of the central nervous system." The Journal of Infectious Diseases **157**(1): 178-180.
- Bellamy, W. T. (1992). "Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays." Drugs **44**(5): 690-708.
- Boff, E., P. G. M. Lopes, T. Spader, L. A. Scheid, E. Loreto, N. F. Dal Forno, V. Aquino, L. C. Severo, J. M. Santurio e S. H. Alves (2008). "Reevaluation of *Candida* susceptibility to amphotericin B: comparative study using isolates from three hospitals in the State of Rio Grande do Sul." Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical **41**(1): 36-40.
- Boyd, M. R. (1989). "Status of the NCI preclinical antitumor drug discovery screen." Princ Pract Oncol Updat **3**: 1-12.
- Brammer, K. W., P. R. Farrow e J. K. Faulkner (1990). "Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans." Reviews of Infectious Diseases **12**(Supplement 3): S318-S326.
- Brass, C., J. N. Galgiani e T. F. Blaschke (1982). "Disposition of ketoconazole, an oral antifungal, in humans." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **21**(1): 151-158.
- Brown, G. D., D. W. Denning e S. M. Levitz (2012). "Tackling Human Fungal Infections." Science **336**(6082): 647-647.
- Brown, H. C. e B. C. S. Rao (1956). "A New Powerful Reducing Agent - Sodium Borohydride in the Presence of Aluminum Chloride and Other Polyvalent Metal Halides." Journal of the American Chemical Society **78**(11): 2582-2588.
- Canuto, M. M. e F. Gutierrez (2002). "Antifungal drug resistance to azoles and polyenes." Lancet Infectious Diseases **2**(9): 550-563.
- Carey, F. A. e R. J. Sundberg (2000). Advanced Organic Chemistry. New York, Plenum Press.
- Carrillo-Muñoz, A. J., G. Giusiano, P. A. Ezkurra e G. Quindós (2006). "Antifungal agents: mode of action in yeast cells." Revista Espanola de Quimioterapia **19**(2): 130-139.
- Chafin, A., D. J. Irvin, M. H. Mason e S. L. Mason (2008). "Synthesis of multifunctional hydroxyethyl tetrazoles." Tetrahedron Letters **49**(23): 3823-3826.
- Chan, M. M. Y. (2002). "Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin." Biochemical Pharmacology **63**(2): 99-104.
- Chiou, C., A. Groll e T. Walsh (2000). "New drugs and novel targets for treatment of invasive fungal infections in patients with cancer." Oncologist **5**(2): 120-135.
- Coste, A., A. Selmecki, A. Forche, D. Diogo, M. E. Bounoux, C. d'Enfert, J. Berman e D. Sanglard (2007). "Genotypic evolution of azole resistance mechanisms in sequential *Candida albicans* isolates." Eukaryotic Cell **6**(10): 1889-1904.
- Cowen, L. E. (2008). "The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype." Nature Reviews Microbiology **6**(3): 187-198.
- Cowen, L. E., A. E. Carpenter, O. Matangkasombut, G. R. Fink e S. Lindquist (2006). "Genetic architecture of Hsp90-dependent drug resistance." Eukaryotic Cell **5**(12): 2184-2188.

- da Silva Ferreira, M. E., J. L. Capellaro, E. dos Reis Marques, I. Malavazi, D. Perlin, S. Park, J. B. Anderson, A. L. Colombo, B. A. Arthington-Skaggs, M. H. Goldman e G. H. Goldman (2004). "In vitro evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance." Antimicrob Agents Chemother **48**(11): 4405-4413.
- Dabholkar, V. V. e R. P. Gavande (2010). "Synthesis and biological evaluation of oxadiazolyl-1, 4-benzothiazines " rasayan journal of chemistry **3**(4): 974-1496.
- Danila, G. (1980). "Isonicotinic acid hydrazide: theories concerning the mechanism of its tuberculostatic action " Revista medico-chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi **84**(2): 297-298.
- Darwish, D. e R. L. Tomilson (1968). "Preparation and Racemization of an Optically Active Sulfonium Ylide . (-)-Ethylmethylsulfonium Phenacylide." Journal of the American Chemical Society **90**(21): 5938-&.
- de Almeida, V. L., A. Leitao, L. D. B. Reina, C. A. Montanari e C. L. Donnici (2005). "Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer DNA-interactive agents: An introduction." Quimica Nova **28**(1): 118-129.
- de Almeida, V. L., J. C. D. Lopes, S. R. Oliveira, C. L. Donnici e C. A. Montanari (2010). "Quantitative Structure-Activity Relationships (Qsar) Studies of Bisbenzamidines with Antifungal Activity." Quimica Nova **33**(7): 1482-1489.
- De Oliveira, R. D., C. M. Maffei e R. Martines (2001). "Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*." Revista da Associação Médica Brasileira **47**: 231-235.
- Decarli, L. e L. Larizza (1988). "Griseofulvin." Mutation Research **195**(2): 91-126.
- Demko, Z. P. e K. B. Sharpless (2001). "Preparation of 5-substituted 1H-tetrazoles from nitriles in water." Journal of Organic Chemistry **66**(24): 7945-7950.
- Denning, D. W. (2002). "Echinocandins: a new class of antifungal." The Journal of Antimicrobial Chemotherapy **49**(6): 889-891.
- Denning, D. W., K. Venkateswarlu, K. L. Oakley, M. J. Anderson, N. J. Manning, D. A. Stevens, D. W. Warnock e S. L. Kelly (1997). "Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **41**(6): 1364-1368.
- Dick, J. D., W. G. Merz e R. Saral (1980). "Incidence of Polyene-Resistant Yeasts Recovered from Clinical Specimens." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **18**(1): 158-163.
- Domagala, J. M. e J. P. Sanchez (1997). "New approaches and agents to overcome bacterial resistance." Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol 32 **32**: 111-120.
- Drabowicz, J., P. Lyzwa e M. Mikolajczyk (1983). "Organosulfur Compounds .35. A New Procedure for Oxidation of Sulfides to Sulfones." Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements **17**(2): 169-172.
- Duschinsky, R., E. Plevan e W. Oberhansli (1960). "Synthesis of 5-Fluoropyrimidine Metabolites." Acta Unio Internationalis Contra Cancrum **16**(3-4): 599-604.
- Edwards, M. L., N. J. Prakash, D. M. Stemerick, S. P. Sunkara, A. J. Bitonti, G. F. Davis, J. A. Dumont e P. Bey (1990). "Polyamine Analogs with Antitumor-Activity." Journal of Medicinal Chemistry **33**(5): 1369-1375.
- Espinel-Ingroff, A., S. Shadomy e R. J. Gebhart (1984). "In vitro studies with R 51,211 (itraconazole)." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **26**(1): 5-9.
- Farrell, N., T. G. Appleton, Y. Qu, J. D. Roberts, A. P. Fontes, K. A. Skov, P. Wu e Y. Zou (1995). "Effects of geometric isomerism and ligand substitution in bifunctional dinuclear platinum complexes on binding properties and conformational changes in DNA." Biochemistry **34**(47): 15480-15486.
- Farrell, N. e Y. Qu (1989). "Chemistry of Bis(Platinum) Complexes - Formation of Trans Derivatives from Tetraamine Complexes." Inorganic Chemistry **28**(18): 3416-3420.
- Feldmesser, M., Y. Kress, A. Mednick e A. Casadevall (2000). "The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*." The Journal of Infectious Diseases **182**(6): 1791-1795.

- Ferenc, R., A. Fabian, O. Farkas e K. Arpad (2009). "Mechanism for the Oxidation of Sulfides and Sulfoxides with Periodates: Reactivity of the Oxidizing Species." European Journal of Organic Chemistry(13): 2102-2111.
- Finnegan, W. G. e R. A. Henry (1962). Substitued tetrazoles. California, China Lake.
- Fischbach, M. A. e C. T. Walsh (2009). "Antibiotics for Emerging Pathogens." Science **325**(5944): 1089-1093.
- Foye, W. O. e S. K. Sengupta (1996). Foye's Principles of Medicinal Chemistry. Baltimore, Willians & Wilkins.
- Fridkin, S. K. e W. R. Jarvis (1996). "Epidemiology of nosocomial fungal infections." Clinical Microbiology Reviews **9**(4): 499-&.
- Fromtling, R. A. (1988). "Overview of medically important antifungal azole derivatives." Clinical Microbiology Reviews **1**(2): 187-217.
- Furukawa, N., S. Ogawa, T. Kawai e S. Oae (1984). "ipso-Substitution of a sulphinyl or sulphonyl group attached to pyridine rings and its application for the synthesis of macrocycles." Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions **1** 1839-1845.
- Gabriel, J. e. a. (2007). The Biology of Cancer. Chichester, John Wiley & Sons.
- Gabriel, S. (1887). "Ueber eine Darstellung primärer Amine aus den entsprechenden Halogenverbindungen." Berichte der Deustschen Chemichen Gesellschaft **20**: 2224.
- Groll, A. H., P. M. Shah, C. Mentzel, M. Schneider, G. JustNuebling e K. Huebner (1996). "Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital." Journal of Infection **33**(1): 23-32.
- Grunberg, E., E. Titsworth e M. Bennett (1963). "Chemotherapeutic Activity of 5-Fluorocytosine." Antimicrob Agents Chemother (Bethesda) **161**: 566-568.
- Hajj, T. E., A. Masroua, J. C. Martin e G. Oescotes (1987). "Synthèse de l'hydroxyméthyl-5 furanne carboxaldéhyde-2 et des traitement acide de sucres sur résines échangeuses d'ions." Bulletin de la Societe Chimique de France **5**: 855-860.
- Hanahan, D. e R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Harrison, G. C. e H. Diehl (1955).  $\beta$ -Ethoxypropionitrile. Organic Syntheses collection. J. W. a. Sons. **3**: 372.
- Hayashi, K., H. J. Schoonbeek e M. A. De Waard (2003). "Modulators of membrane drug transporters potentiate the activity of the DMI fungicide oxpoconazole against Botrytis cinerea." Pest Management Science **59**(3): 294-302.
- Heeres, J., L. J. J. Backx, J. H. Mostmans e J. Van Cutsem (1979). "Antimycotic imidazoles. Part 4. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new potent orally active broadspectrum antifungal agent." Journal of Medicinal Chemistry **22**(8): 1003-1005.
- Hibbert, H., S. Z. Perry e K. A. Taylor (1929). "Symmetrical tetrabromo-ethyl ether and "so-called" tetrabromobutyraldehyde." Journal of the American Chemical Society **51**(5): 1551-1555.
- Huber, P. C., C. H. Maruiama e W. P. Almeida (2010). "P-Glycoprotein and Multidrug Resistance: Structure-Activity Relationships of Modulators." Quimica Nova **33**(10): 2148-2154.
- Iciek, M., I. Kwiecien e L. Wlodek (2009). "Biological Properties of Garlic and Garlic-Derived Organosulfur Compounds." Environmental and Molecular Mutagenesis **50**(3): 247-265.
- Jones, K. E., N. G. Patel, M. A. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J. L. Gittleman e P. Daszak (2008). "Global trends in emerging infectious diseases." Nature **451**(7181): 990-U994.
- Jorgensen, J. H. e M. J. Ferraro (2009). "Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices." Clinical Infectious Diseases **49**(11): 1749-1755.
- Katiyar, S., M. A. Pfaller e T. Edlind (2006). "*Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **50**: 2892-2894.
- Kelland, L. (2007). "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy." Nature Reviews Cancer **7**(8): 573-584.
- Kolaczowski, M., K. Michalak e N. Motohashi (2003). "Phenothiazines as potent modulators of yeast multidrug resistance." International Journal of Antimicrobial Agents **22**(3): 279-283.

- Krishna, R. e L. D. Mayer (2000). "Multidrug resistance (MDR) in cancer - Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs." European Journal of Pharmaceutical Sciences **11**(4): 265-283.
- Kumar, A. (1987). "Thiodialkylenyl-5-bistetrazoles & thiuronium salts as potential slow acting anticancer agents." Indian Journal of Chemistry **26B**: 509-601.
- Kumar, C. N. S. S. P., D. K. Parida, A. Santhoshi, A. K. Kota, B. Sridhar e V. J. Rao (2011). "Synthesis and biological evaluation of tetrazole containing compounds as possible anticancer agents." Medchemcomm **2**(6): 486-492.
- Kumar, D., R. Singh e M. Sharma (2011). "Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some new thiodihydrazones derived from thiodihydrazides." Acta Ciencia indica, Chemistry **37**(1): 23-27.
- Levanova, E., T. Vakul'skaya, S. Shevchenko, V. Grabel'nykh, E. Sukhomazova, A. Elaev, A. Kolesnikov, L. Klyba, N. Russavskaya, A. Albanov e N. Korchevin (2008). "Synthesis and paramagnetic properties of polytelluride oligomers." Russian Journal of Organic Chemistry **44**(10): 1422-1427.
- MacDonald, L., C. Baker e C. Chenoweth (1998). "Risk factors for candidemia in a children's hospital." Clinical Infectious Diseases **26**(3): 642-645.
- Marchetti, O., P. Moreillon, M. P. Glauser, J. Bille e D. Sanglard (2000). "Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **44**(9): 2373-2381.
- McAlester, G., F. O'Gara e J. P. Morrissey (2008). "Signal-mediated interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*." Journal of Medical Microbiology **57**(5): 563-569.
- Mehanna, H. M., T. Kuo, J. Chaplin, G. Taylor e R. P. Morton (2004). "Fungal laryngitis in immunocompetent patients." Journal of Laryngology and Otology **118**(5): 379-381.
- Melo, J. O. F., P. M. Ratton, R. Augusti e C. L. Donnici (2004). "Preparation of novel 1,2,3-triazoles and a comparative study involving two recent methods for 1,2,3-triazole synthesis." Synthetic Communications **34**(2): 369-376.
- Menezes, E. A., L. G. Mendes e F. A. Cunha (2009). "Antifungal resistance of *Candida tropicalis* isolated in the State of Ceara." Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical **42**(3): 354-355.
- Mitscher, L. A., S. P. Pillai, E. J. Gentry e D. M. Shankel (1999). "Multiple drug resistance." Medicinal Research Reviews **19**(6): 477-496.
- Mitsunobu, O. (1991). Gabriel Synthesis. Comprehensive Organic Synthesis. T. a. I. Fleming, Elsevier. **6**: 79-85.
- Montanari, M. L. C., C. A. Montanari, D. PiloVeloso e Q. B. Cass (1997). "Estimation of the RP-HPLC lipophilicity parameters log k', and log k(w), a comparison with the hydrophobicity index phi(0)." Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies **20**(11): 1703-1715.
- Morens, D. M., G. K. Folkers e A. S. Fauci (2004). "The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases." Nature **430**(6996): 242-249.
- Morita, T. e R. M. V. Assumpção (1986). Manual de Soluções, Reagentes e Solventes: Padronização – Preparação – Purificação. São Paulo, Edgard Blücher Ltda.
- Nakrasov, V. V. J. B. (1927). "β, β'-Dicianodiethyl sulfide." J. Russ Phys-Chem Soc **59**: 921-924.
- Nandy, S. K., J. Liu e A. A. Padmapriya (2008). "A convenient method for the syntheses of tetrahydrofuran moiety from furan by catalytic transfer of hydrogenation with ammonium formate." Tetrahedron Letters **49**(15): 2469-2471.
- Neckers, L. (2002). "Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents." Trends in Molecular Medicine **8**(4): S55-S61.
- Niimi, K., K. Maki, F. Ikeda, A. R. Holmes, E. Lamping, M. Niimi, B. C. Monk e R. D. Cannon (2006). "Overexpression of *Candida albicans* CDR1, CDR2, or MDR1 does not produce significant changes in echinocandin susceptibility." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **50**(4): 1148-1155.
- Niimi, M., N. A. Firth e R. D. Cannon (2010). "Antifungal drug resistance of oral fungi." Odontology **98**(1): 15-25.

- Nogueira, L. J. (2006). Síntese e Avaliação de Lipofilia e de Precursores Dendriméricos Amidínicos Aza- e Tio-Substituídos com Atividade Anti-Tumoral. Departamento de Química. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. **Mestrado**.
- Nogueira, L. J. (2006). Síntese, Avaliação da Atividade Antifúngica e Determinação do Log P de Precursores Dendriméricos. Departamento de Química. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. **Mestrado**.
- Nogueira, L. J., M. A. de Resende, S. R. Oliveira, M. H. de Araujo, T. F. F. Magalhaes, M. B. de Oliveira, C. V. B. Martins, M. T. P. Lopes, A. C. A. E. Silva e C. L. Donnici (2011). "In vitro susceptibility of *Aspergillus* spp. to dithiocarbamate organoruthenium compounds." Mycoses **54**(5): E323-E329.
- O'Gara, E. A., D. J. Hill e D. J. Maslin (2000). "Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*." Applied and Environmental Microbiology **66**(5): 2269-2273.
- Ogura, K., M. Suzuki e G. Tsuchihashi (1980). "Oxidation of Methyl (Methylthio)Methyl Sulfoxide." Bulletin of the Chemical Society of Japan **53**(5): 1414-1416.
- Oliveira, S. R., L. J. Nogueira, R. Augusti, M. A. D. Stoianoff, C. M. Aguilar, W. R. Rocha e C. L. Donnici (2012). "Influence of oxidation state of sulfur on the dissociation of [Tz-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S(O)<sub>m</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Tz+Na<sup>+</sup>] adducts generated by electrospray ionization (Tz = tetrazole ring; n=2, 3; m=0, 1, 2)." Rapid Communications in Mass Spectrometry **26**(3): 377-384.
- Oliveira, S. R., L. J. Nogueira, C. L. Donnici, T. F. F. Magalhaes, C. V. B. Martins, C. A. Montanari e M. A. Resende (2011). "Antifungal activity of tri- and tetra-thioureido amino derivatives against different *Candida* species." Mycoses **54**(5): E389-E393.
- Osby, J. O., S. W. Heinzman e B. Ganem (1986). "Studies on the Mechanism of Transition-Metal-Assisted Sodium-Borohydride and Lithium Aluminum-Hydride Reductions." Journal of the American Chemical Society **108**(1): 67-72.
- Panneerselvam, P. e G. G. Ganesh (2011). "Synthesis and Antimicrobial Screening of Some Novel 2, 5-Disubstituted 1, 3, 4-oxadiazole Derivatives." E-Journal of Chemistry **8**: S149-S154.
- Passos, X. S., W. S. Sales, P. J. Maciel, C. R. Costa, K. C. Miranda, A. Lemos Jde, A. Batista Mde e R. Silva Mdo (2005). "Candida colonization in intensive care unit patients' urine." Mem Inst Oswaldo Cruz **100**(8): 925-928.
- Pedrosa, M. T. C. (2003). Síntese de Tetrazóis e Oxadiazóis a partir do D-Glicopirásídeo de Metila. Departamento de Química. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. **Doutorado**.
- Perfect, J. R., D. T. Durack, J. D. Hamilton e H. A. Gallis (1982). "Failure of ketoconazole in cryptococcal meningitis." Journal of the American Medical Association **247**(24): 3349-3351.
- Perlin, D. S. (2007). "Resistance to echinocandin-class antifungal drugs." Drug Resist Updat **10**(3): 121-130.
- Perrin, D. D., W. L. F. Armarego e D. R. Perrin (1980). Purification of laboratory chemical. Oxford, Pergamon Press.
- Pfaller, M. A. (2012). "Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment." The American Journal of Medicine **125**: S3-S13.
- Pfaller, M. A. e D. J. Diekema (2004). "Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: Concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*." Journal of Clinical Microbiology **42**(10): 4419-4431.
- Pfaller, M. A. e D. J. Diekema (2010). "Epidemiology of Invasive Mycoses in North America." Critical Reviews in Microbiology **36**(1): 1-53.
- Polak, A. (1990). Chemotherapy of Fungal Diseases. R. JF, Springer-Verlag: 153-182.
- Rajski, S. R. e R. M. Williams (1998). "DNA cross-linking agents as antitumor drugs." Chemical Reviews **98**(8): 2723-2795.
- Rapposelli, S. (2010). Multifunctional Drugs: New Chimeras in Medicinal Chemistry Transworld Research Network .
- Reichstein, T. (1926). "5-Hydroxymethylfurfural." Helvetica Chimica Acta **9**: 1066-1068.

- Reina, L. D., C. A. Montanari, C. L. Donnici, I. C. N. Diogenes e I. D. Moreira (2002). "On the interaction of organosulfur compounds from garlic with cytochrome-C: An electrochemical study." Quimica Nova **25**(1): 5-9.
- Rex, J. H., B. D. Alexander, D. Andes, B. Arthington-Skaggs, S. D. Brown, V. Chaturvedi, M. A. Ghannoum, A. Espinel-Ingroff, C. C. Knapp, L. Ostrosky-Zeichner, M. A. Pfaller, D. J. Sheehan e T. J. Walsh (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard (M27-A3). Pennsylvania, Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Richards, M. J., J. R. Edwards, D. H. Culver, R. P. Gaynes e N. N. I. S. System (1999). "Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States." Critical Care Medicine **27**(5): 887-892.
- Routh, M. M., J. S. Raut e S. M. Karuppaiyl (2011). "Dual Properties of Anticancer Agents: An Exploratory Study on the in vitro Anti-Candida Properties of Thirty Drugs." Chemotherapy **57**(5): 372-380.
- Ruddon, R. W. (2007). Cancer Biology. Oxford, Oxford University Press.
- Ruff, F. e A. Kucsman (1985). "Mechanism of the Oxidation of Sulphides with Sodium Periodate." Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions **2**(5): 683.
- Ruping, M. J. G. T., J. J. Vehreschild e O. A. Cornely (2008). "Patients at High Risk of Invasive Fungal Infections When and How to Treat." Drugs **68**(14): 1941-1962.
- Sabo, J. A. e S. M. Abdel-Rahman (2000). "Voriconazole: a new triazole antifungal." Annals of Pharmacotherapy **34**(9): 1032-1043.
- Salzberg, P. L. e J. V. Supniewski (1927).  $\beta$ -Bromoethylphthalimide.
- Sanglard, D. e F. C. Odds (2002). "Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences." Lancet Infectious Diseases **2**: 73-85.
- Satzinger, G. (1960). "5-Substituierte Und 1.5-Kondensierte Tetrazole." Annalen Der Chemie-Justus Liebig **638**(1): 159-173.
- Scudiero, D. A., R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff e M. R. Boyd (1988). "Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines." Cancer Research **48**(17): 4827-4833.
- Selmecki, A., A. Forche e J. Berman (2006). "Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*." Science **313**: 367-370.
- Shaabani, A. e A. H. Rezayan (2007). "Silica sulfuric acid promoted selective oxidation of sulfides to sulfoxides or sulfones in the presence of aqueous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>." Catalysis Communications **8**(7): 1112-1116.
- Shao, P. L., L. M. Huang e P. R. Hsueh (2007). "Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections." International Journal of Antimicrobial Agents **30**(6): 487-495.
- Silva, J. A. G. (2012). Estimativa 2012 - Incidência de Câncer no Brasil. I. N. d. C.-M. d. Saúde. Rio de Janeiro.
- Silva, L. L. (2005). Estudo da Síntese e da Interação de Precursores Dendriméricos com DNA e Avaliação da Atividade Antifúngica. Departamento de Química. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. **Mestrado**.
- Silverstein, R. M., G. C. Bassler e T. C. Morrill (1991). Spectroscopic identification of organic compounds. New York, John Wiley & Sons.
- Smith, M. B. e J. March (2007). March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure. New Jersey, John Wiley & Sons.
- Spence, R. A. J. e P. G. Jonhston (2001). Oncology. Oxford.
- Standards, N. C. f. C. L. (P.a. 2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Wayne.
- Stone, E. A., H. B. Fung e H. L. Kirschenbaum (2002). "Caspofungin: an echinocandin antifungal agent." Clinical Therapeutics **24**(3): 351-377.
- Sundriyal, S., R. K. Sharma e R. Jain (2006). "Current advances in antifungal targets and drug development." Current Medicinal Chemistry **13**(11): 1321-1335.
- Taki, M., Y. Kawashima, N. Sakai, T. Hirayama e Y. Yamamoto (2008). "Effects of heteroatom substitution on the structures, physicochemical properties, and redox behavior of nickel(II) complexes with pyridine-containing macrocyclic ligands." Bulletin of the Chemical Society of Japan **81**(5): 590-597.

- Tassel, D. e M. A. Madoff (1968). "Treatment of Candida Sepsis and Cryptococcus Meningitis with 5-Fluorocytosine - a New Antifungal Agent." Journal of the American Medical Association **206**(4): 830-836.
- Tietze, L. F., H. P. Bell e S. Chandrasekhar (2003). "Natural product hybrids as new leads for drug discovery." Angewandte Chemie-International Edition **42**(34): 3996-4028.
- Timko, J. M., S. S. Moore, D. M. Walba, P. C. Hiberty e D. J. Cram (1977). "Host-Guest Complexation .2. Structural Units That Control Association Constants between Polyethers and Tert-Butylammonium Salts." Journal of the American Chemical Society **99**(13): 4207-4219.
- Tobudic, S., C. Kratzer e E. Presterl (2012). "Azole-resistant Candida spp. - emerging pathogens?" Mycoses **55**: 24-32.
- Tools, S. (2012). "<http://www.science-and-fun.de/tools/>." Retrieved 27/06/2012.
- Travis, J. (1994). "Reviving the Antibiotic Miracle." Science **264**(5157): 360-362.
- Tsao, S. M. e M. C. Yin (2001). "In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **47**(5): 665-670.
- Tsiakopoulos, N., C. Damianakos, G. Karigiannis, D. Vahliotis, D. Papaioannou e G. Sindona (2002). "Syntheses of crowned polyamines using isolable succinimidyl esters of N-tritylated linear amino acids and peptides." Arkivoc: 79-104.
- Van Der Meer, J. W., J. J. Keuning e H. W. Scheijgrond (1980). "The influence of gastric acidity on the bio-availability of ketoconazole." The Journal of Antimicrobial Chemotherapy **6**(4): 552-554.
- Vanden Bossche, H. (1997). "Mechanisms of antifungal resistance." Revista Iberoamericana de Micología **14**: 44-49.
- Vanden Bossche, H., D. W. Warnock, B. Dupont, D. Kerridge, S. Sengupta, L. Improvisi, P. Marichal, F. C. Odds, F. Provost e O. Ronin (1994). "Mechanisms and Clinical Impact of Antifungal Drug-Resistance." Journal of Medical and Veterinary Mycology **32**: 189-202.
- Vandeputte, P., S. Ferrari e A. T. Coste (2012). "Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections." Int J Microbiol 713687.
- Waitzberg, V. R. e L. C. Gayotto (1982). "Fulminant hepatitis in patients with mixed connective tissue disease under antitubercular treatment with hydrazide and rifampicin " Revista do Hospital das Clinicas **37**(1): 48-51.
- WHO, W. H. O. (2011) "WHO Model List of Essential Medicines (17th edition)."
- Woolley, D. W. (1944). "Some new aspects of the relationship of chemical structure to biological activity." Science **100**(2609): 579-583.
- Xia, Y. e K. Lee (2010). "Targeting Multidrug Resistance with Small Molecules for Cancer Therapy." Biomolecules & Therapeutics **18**(4): 375-385.