

**SÍNTESE, ESTUDOS DE RELAÇÕES ESTRUTURA-ATIVIDADE E DA  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVOS AGENTES  
QUIMIOTERÁPICOS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS  
INFECCIOSAS EMERGENTES**

**SHEILA RODRIGUES OLIVEIRA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS - ICEX  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SHEILA RODRIGUES OLIVEIRA**

**“SÍNTESE, ESTUDOS DE RELAÇÕES ESTRUTURA-ATIVIDADE E DA  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVOS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS  
PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES”**

SHEILA RODRIGUES OLIVEIRA

LINHA DE PESQUISA: SÍNTESE ORGÂNICA E QUÍMICA MEDICINAL

ORIENTADOR: PROF. Dr. CLAUDIO LUIS DONNICI  
Co-orientador: Prof. Dr. Adão Aparecido Sabino

BELO HORIZONTE  
JULHO de 2008

UFMG 722<sup>a</sup>.  
D-428<sup>a</sup>.

**SHEILA RODRIGUES OLIVEIRA**

**“SÍNTESE, ESTUDOS DE RELAÇÕES ESTRUTURA-ATIVIDADE E DA  
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVOS AGENTES QUIMIOTERÁPICOS  
PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES”**

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Química do Instituto de Ciências Exatas da  
Universidade Federal de Minas Gerais como  
requisito parcial para a obtenção de grau de  
Mestre em Química  
Química Orgânica

Belo Horizonte  
2008

Oliveira, Sheila Rodrigues.  
048s Síntese, estudos de relações estrutura-atividade e  
2008 da atividade antifúngica de novos agentes  
D quimioterápicos para tratamento de doenças infecciosas  
emergentes / Sheila Rodrigues Oliveira. 2008.

xv, 95 f. : il.

Orientador: Claudio Luis Donnici.

Co-orientador: Adão Aparecido Sabino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais. Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Relação estrutura -  
atividade- Teses 3. Agentes quimioterápicos - Teses  
4. doenças Infecciosas emergentes I. Donnici., Claudio  
Luis, Orientador II. Sabino, Adão Aparecido, Co-  
orientador III. Título.

CDU 043



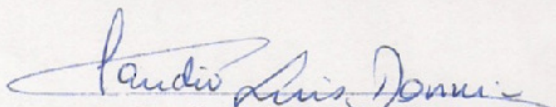
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEX  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3499-5732  
FAX: 031 - 3499-5700  
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br

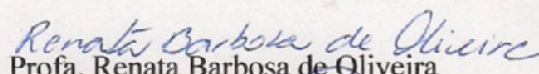


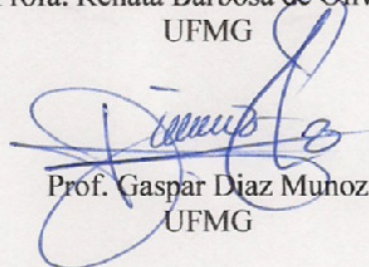
**"Síntese, Estudos de Relações Estrutura-Atividade e da Atividade Antifúngica de Novos Agentes Quimioterápicos para Tratamento de Doenças Infecciosas Emergentes"**

**Sheila Rodrigues Oliveira**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Claudio Luis Donnici - Orientador  
UFMG

  
Profa. Renata Barbosa de Oliveira  
UFMG

  
Prof. Gaspar Diaz Muhoz  
UFMG

Belo Horizonte, 16 de julho de 2008.

A presente dissertação de Mestrado foi realizada sob orientação do Professor Doutor Claudio Luis Donnici, co-orientação do Professor Doutor Adão Aparecido Sabino e com a colaboração de:  
Professora Doutora Maria Aparecida Resende - Departamento de Microbiologia, ICB-UFMG,  
Professor Doutor Carlos Alberto Montanari, Instituto de Química - USP de São Carlos e da  
Professora Doutora Míriam Lopes do ICB-UFMG

Não apenas devo agradecer como também dedicar este trabalho às pessoas que muito me apoiaram:

A Deus por ter me dado a vida e por ter me concedido saúde, força e oportunidades de conhecer pessoas muito especiais.

Aos meus pais, Lourdes e Nestor, pelo apoio e amor incondicional.

Agradeço à minha irmã, Michelle, pela sinceridade, pelos conselhos e pela torcida.

Ao meu irmão Talmer a quem eu amo muito.

Ao Lucas pelo carinho, atenção, pela convivência...

Ao Professor Claudio Luis Donnici, não há palavras que possam traduzir o meu imenso agradecimento a esta figura humana de caráter e sensibilidade ímpares, quem sempre me ajudou e me inspirou a continuar.

À minha amiga de todas as horas Helga, pelo apoio de todos os dias.

Aos meus amigos do laboratório 252: Láuris, Viviane, Henrique, Marianne, Marcos Roberto, Marcelle, Bruno, Priscilla e Marilda pela amizade e ajuda... e ao Thiago

Às Professoras Maria Aparecida, Míriam Lopes do ICB-UFMG e à Cleide e Ana Cândida pela generosidade e paciência.

Ao professor Adão Sabino pela co-orientação.

Aos Professores Ângelo de Fátima, Fernando Carazza, Ana Luiza de Quadros e Lucenir Pains pelas dicas e pela amizade.

Agradeço às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Química da UFMG (Paulete, Lílian e Kátia) pela atenção e disponibilidade constantes.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Química da UFMG pela atenção e pelo constante trabalho em prol de nosso ambiente de trabalho. Em especial um agradecimento carinhoso à funcionária Arlete por proporcionar um ambiente agradável pelo seu trabalho e pela sua pessoa.

Agradeço também ao CNPQ pela bolsa concedida e à FAPEMIG (Processos: CEX 817/06 e CEX APQ-4911-5.02/07) pelos investimentos financeiros que foram essenciais para a realização deste projeto.

*“Não há nada mais interessante do que ciência.”*  
Bethe, Hans



## Índice Geral

I- INTRODUÇÃO .....	24
I.1-DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS: DO RANDÔMICO AO BIOISOSTERISMO, DO XAMÃ AO QUÍMICO MEDICINAL..	24
I.1.A-FATORES QUE INFLUENCIAM A ATIVIDADE DE UM COMPOSTO-PROTÓTIPO- TIPOS DE MODIFICAÇÃO MOLECULAR .....	26
I.1.a.1-Lipofilia:.....	26
I.1.a.2-Rigidez x Flexibilidade .....	29
I.1.a.3-Tamanho do Análogo.....	30
I.1.a.4-Alteração dos Substituintes - Bioisosterismo .....	31
I.1.a.5-Modificações Moleculares e Relações Quantitativas Estrutura-Atividade (QSAR).....	32
I.2 NEOPLASIAS E COMPOSTOS QUE INTERAGEM COM DNA .....	39
I.2.a.HÍBRIDOS: NOVOS COMPOSTOS-PROTÓTIPO ANTINEOPLÁSICOS .....	42
I.3-DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES - MICRORGANISMOS - FUNGOS E BACTÉRIAS.....	46
I.3.a-Algumas das Principais Infecções Causadas por Fungos.....	48
I.3.a.1-Aspergilose: .....	48
I.3.a.2-Candidíase.....	49
I.3.a.3-Paracoccidioidomicose.....	50
I.3.a.4- Esporotricose.....	51
I.3.a.5- Criptococose: .....	52
I.3.B. AGENTES QUIMIOTERÁPICOS ANTIMICROBIANOS - ANTIBIÓTICOS .....	52
I.4-ESTUDO DE PRECURSORES DENDRÍMICOS .....	58
I.4.a - Estudo da Atividade Antifúngica de Precursores Dendrímicos.....	58
I.4.b- Determinação do log $k_w$ de Precursores Dendrímicos .....	61
II.JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO .....	65
III. OBJETIVOS .....	67
IV-RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	68
IV.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	68
IV.2- OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS TIOUREIDO-SUBSTITUÍDOS .....	69
IV.2.a-Obtenção de 2,2,2-triclorotrietilamina e N,N,N',N'-Tetrakis(2-cloroetil)etilenodiamina.....	70
IV.2.b-Obtenção de tris(2-tioureidoetil)-(P1) e tris(2-(1-metil-2-tioureidoetil)aminas (P2) .	74
IV.2.c-Obtenção de tris(2-(1,3-dimetil)-tioureidoetil)amina (P3) e N,N,N',N'-tetrakis(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)etilenodiamina (P6) .	79
IV.2.d- Obtenção de N,N,N', N' - tetrakis (2-tioureidoetil)etilenodiamina (P4) .	86
IV.2.e-Obtenção de N,N,N',N'-tetrakis(2-metil-tioureido-etil)etilenodiamina (P5).....	89
IV.2.f- Obtenção de 1,7-bis-(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)-4-tia-heptano (P7) .....	92
IV.3- DETERMINAÇÃO DO LOG $K_w$ PARA OS COMPOSTOS P1 A P7.....	95
IV.4- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS COMPOSTOS P1 A P7 .....	96
IV.4.a- Resultados de Atividade Antifúngica.....	96
IV.4.b- Teste de Atividade Fungicida .....	98
IV-5- Avaliação da Atividade Antitumoral dos Compostos P1 e P2.....	100
V. PARTE EXPERIMENTAL .....	101
V.1. - PREPARAÇÕES EFETUADAS .....	101
V.1.2.1 - Preparação do N,N,N', N' - Tetrakis (2-cloroetil)etilenodiamina (PB) .....	73
V.1.3 - PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE TRIS-TIOUREIDO-DERIVADOS: Preparação de tris(2-tioureidoetil)amina (P1) em EtOH .....	74
V.1.3.1-Preparação de tris(2-tioureido)etilamina (P1) em i-PrOH .....	75
V.1.3.2-Preparação de tris(2-(1-metil-2-tioureidoetil)amina (P2) em EtOH.....	75
V.1.3.3 - Preparação de tris(2-(1-metil-2-tioureidoetil)amina (P2) em i-PrOH .....	76
V.1.3.4- Preparação de tris(2-(1,3-dimetil)-tioureidoetil)amina (P3) em i-PrOH.....	76

V.1.4 - PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE TETRA-TIOUREIDO-DERIVADOS: Obtenção de N,N,N', N' - tetrakis (2-tioureidoetil) etilenodiamina (P4) em presença de Carbonato de sódio .....	77
V.1.4.1 - Obtenção do N,N,N',N'-Tetrakis(2-tioureidoetil) etilenodiamina (P4) sem carbonato de sódio.....	78
V.1.4.2 - Obtenção do N,N,N',N'-tetrakis(2-metil-tioureido-etil)etilenodiamina (P5).....	79
V.1.4.3 - Obtenção do N,N,N',N'-tetrakis(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)etileno-diamina (P6) 80	
V.1.5 - Obtenção de 1,7-bis-(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)-4-tia-heptano (P7).....	81
V.2 - DETERMINAÇÃO DO LOG K <sub>w</sub> PARA OS COMPOSTOS P1 A P7.....	81
V.3 - ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA .....	84
V.3.1-Considerações Gerais.....	84
V.3.2 - Técnica da microdiluição .....	84
V.3.3 - Solventes utilizados na solubilização .....	85
V.3.4 - Meio de cultura.....	85
V.3.5 - Origens dos microrganismos utilizados nos ensaios .....	85
V.3.6- Avaliação da Atividade Antifúngica dos Compostos P1 a P7.....	85
V.3.7- Teste de Atividade Fungicida .....	87
V.3.7.a- Preparação das Placas de Petri .....	87
V.3.7.b- Avaliação da Atividade Fungicida .....	87
V.4 - ESTUDOS DA ATIVIDADE ANTITUMORAL - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% DA POPULAÇÃO CELULAR (IC <sub>50</sub> ).....	87
V.4.1 - Meio de Cultura Celular.....	88
V.4.2 - O Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab) .....	89
V.4.3 - Os Reagentes Utilizados.....	89
V.4.4 - Aparelhos.....	89
V.4.5 - Estudo da Atividade Antitumoral .....	89
VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	91

### Índice de Tabelas

Tabela 1: Dados de Coeficiente de Partição (log P e de P) de Alguns Compostos Devido à Introdução de Grupamentos Metila.....	26
Tabela 2: Percentagem de Incidência de Casos de <i>Candida spp.</i> Relatadas 127 Instituições de 39 Países do Mundo entre 1997 e 2003, para as Cinco Espécies que mais Causam Infecções .....	50
Tabela 3: Alguns Antibióticos em Uso Atualmente.....	54
Tabela 4: Alguns dos Compostos com Atividade Antifúngica Testada por Supuran e colaboradores.....	57
Tabela 5: Derivados Tipo Precursores Dendriméricos Funcionalizados com Grupo Tioureido.....	58
Tabela 6: Nomenclatura Oficial dos Compostos Preparados nesta Dissertação.....	68
Tabela 7: Valores De Log K para as Diferentes Concentrações de Compostos de P1 a P7 .....	96
Tabela 8: Valores de Log K <sub>w</sub> e Log P Calculados para P1 a P7.....	96
Tabela 9: Concentração Inibitória Mínima dos Compostos que Apresentaram Atividade Inibitória.....	97
Tabela 10: Concentração Fungicida Mínima dos Compostos P6 e P7.....	98
Tabela 11: Dados gerais da Atividade antifúngica dos compostos estudados nesta dissertação (P1 a P7) e em trabalhos anteriores (A-L) .....	99

Tabela 12: Concentrações de Atividade Anticancerígena dos Compostos P1 e P2.....	100
Tabela 16: Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e IV de PA.....	102
Tabela 17: Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e Dept de PB .....	103
Tabela 18: Dados de IV de PB.....	103
Tabela 19: Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e Dept de P1 .....	104
Tabela 20: Dados de IV de P1.....	104
Tabela 21: Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e Dept de P2 .....	105
Tabela 22: Dados de IV de P2.....	105
Tabela 23: Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e Dept de P3 .....	106
Tabela 24: Dados de IV de P3.....	106
Tabela 25: Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e Dept de P4.....	107
Tabela 26: Dados de IV de P4 .....	107
Tabela 27: Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e Dept de P5.....	108
Tabela 28: Dados de IV de P5 .....	108
Tabela 29: Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e Dept de P6.....	109
Tabela 30: Dados de IV de P6.....	109
Tabela 31: Dados de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e Dept de P7 .....	110
Tabela 32: Dados de IV de P7.....	110
Tabela 33: Valores de log K para os padrões utilizados para diferentes porcentagens de metanol.....	111
Tabela 34: Valores do log $P_{\text{oct}}$ obtidos na literatura e log $k_w$ para todos os padrões cromatográficos.....	112
Tabela 35: Valores calculados de fatores de capacidade (K) para as diferentes concentrações de compostos de P1 a P10.....	113
Tabela 36: Correlação entre log K e concentração de metanol.....	113

### Índice de Figuras

Figura 1: Representação Esquemática da Teoria Chave-Fechadura.....	24
Figura 2: Estrutura de Algumas Sulfas com Atividade Antibacteriana.....	25
Figura 3: Estruturas da Isoniazida e Ácido 2-Metilisonicotínico.....	29
Figura 4: Estruturas da Imipramina ( $\alpha= 65^\circ$ , Antidepressivo) e Clorpromazina ( $\alpha= 25^\circ$ , Neuroléptico) .....	29
Figura 5: Linolato de Quinino e seu Análogo Octadecatrienato.....	30
Figura 6: Compostos Aromáticos Bis-amidínicos com Atividade Antimicrobiana.....	31
Figura 7: Estruturas da 4-Metil-Benzenossulfonamida e da Astromicida.....	32
Figura 8: Robin Ganellin, Graham J. Durant, Michael E. Parsons e James W. Black no Evento Comemorativo Promovido pelas Sociedades Britânica e Americana de Química dos 25 Anos da Cimetidina.....	35
Figura 9: Tautômeros da Histamina (16 e 17); Tautômeros da Metil-histamina (18 e 19);	

intermediários da Cimetidina (20 a 23).....	35
<b>Figura 10:</b> Visualização Esquemática De Ligações De Hidrogênio, Doadores E Receptores Nas Extremidades Das Bases A:T E G:C Segundo O Modelo De Watson-Crick .....	37
<b>Figura 11:</b> Visualização do Potencial Eletrostático da Superfície da Dupla Estrutura Cristalina do Oligo-nucleotídeo .....	37
<b>Figura 12:</b> Estruturas de Distamicina, Netropsina e Hoechst 33258.....	39
<b>Figura 13:</b> Visualização da Estrutura Cristalina da Netropsina Complexada com d(CGCGAATTCG CG)(NDB Código GDLB05) .....	39
<b>Figura 14:</b> Compostos Nitrogenados que Apresentam Atividade Antitumoral.....	40
<b>Figura 15:</b> Agentes Antitumorais do Grupo dos Alquilsulfonatos.....	41
<b>Figura 16:</b> Equilíbrios Químicos da Hidratação da <i>cis-Pt</i> .....	41
<b>Figura 17:</b> Complexos de Platina com Bis-Aminas.....	42
<b>Figura 18:</b> Alcalóides indólicos vimblastina, vincristina, catarantina e vindolina.....	43
<b>Figura 19:</b> Estruturas do híbrido (42) formado por taxol (43) e camptotecina (44).....	43
<b>Figura 20:</b> Composto híbrido 45 que apresenta seletividade para células de câncer de mama.....	44
<b>Figura 21:</b> Estruturas nitrogenadas mistas tipo espermidina-clorambucil 48 e 49; tipo intercalante-clorambucil 50 e 52.....	45
<b>Figura 22:</b> Estrutura de misto polifuncionalizado tipo clorambucil U.....	45
<b>Figura 23:</b> Alguns dos tiazóis 2,4-dissubstituídos estudados por El-Subbagh e Obaid.....	46
<b>Figura 24:</b> Alguns dos heterocíclicos sulfonamídicos tioureído-substituídos estudados por Supuran e colaboradores.....	46
<b>Figura 25:</b> Os micélios de <i>A. fumigatus</i> denominados aspergilomas.....	49
<b>Figura 26:</b> Colônia de <i>C. albicans</i> , a principal espécie patogênica do gênero <i>Candida spp.</i> .....	50
<b>Figura 27:</b> Aparência microscópica da colônia de <i>P. brasiliensis</i> em cultura de agar.....	51
<b>Figura 28:</b> Colônia de <i>S. schenkii</i> .....	52
<b>Figura 29:</b> Esporos de <i>C. neoformans</i> .....	52
<b>Figura 30:</b> Fármacos que interagem com o DNA: Metalaxyl e LY214352.....	54
<b>Figura 31:</b> Novos agentes antifúngicos.....	55
<b>Figura 32:</b> Compostos estudados por Cameron e colaboradores .....	56
<b>Figura 33:</b> Alguns dos compostos com atividade antifúngica testada por Supuran e colaboradores .....	57
<b>Figura 34:</b> Estrutura geral dos compostos testados contra o vírus da herpes por Grandi e colaboradores.....	57
<b>Figura 35:</b> Estrutura e atividade antifúngica contra <i>Candida spp.</i> de derivados tioureído estudados com a variação do grau de alquilação.....	58
<b>Figura 36:</b> Alinhamento molecular das estruturas dos derivados tipo tioureído estudados.....	59
<b>Figura 37:</b> Análise de PCA obtida pelo programa TSAR®.....	60
<b>Figura 38:</b> Representação esquemática da medida de parâmetro de lipofilia por RP-HPLC, da medida de valor de log k e da extrapolação para obtenção de log kw .....	63

Figura 39: Correlação entre $\log k_w$ e $P_{oct}$ para os padrões cromatográficos.....	64
Figura 40: Estrutura geral do composto com atividade antitumoral.....	65
Figura 41: Retrossíntese para obtenção dos compostos estudados.....	66
Figura 42: Estrutura geral dos compostos preparados.....	67
Figura 43: Reação geral para a síntese de tioureidos.....	69
Figura 44: 2,2,2-triclorotrietilamina (PA) e N,N,N', N'-Tetrakis (2-cloroetil) etilenodiamina (PB).....	70
Figura 45: Espectro na região do infravermelho de PB.....	71
Figura 46: Espectro de RMN $^1H$ de PA .....	71
Figura 47: Espectro de RMN $^1H$ de PB.....	72
Figura 48: Espectro RMN $^{13}C$ PA.....	72
Figura 49: Espectro RMN $^{13}C$ PB.....	73
Figura 50: DEPT de PB.....	73
Figura 51: Tris(2-tioureidoetil)amina (P1) e tris(2-(1-metil-2-tioureidoetil)amina (P2).....	74
Figura 52: Espectros na região do IV de PA (acima) e de P1 (abaixo) .....	75
Figura 53: Espectros na região do IV de PA (acima) e de P2 (abaixo) .....	75
Figura 54: Espectros de RMN $^1H$ de P1.....	76
Figura 55: Espectros de RMN $^1H$ de P2.....	77
Figura 56: Espectro de RMN $^{13}C$ de P1.....	77
Figura 57: Espectro de RMN de $^{13}C$ P2.....	78
Figura 58: Espectros de DEPT de P1.....	78
Figura 59: Espectros de DEPT de P2.....	79
Figura 60: Tris(2-(1,3-dimetil)-tioureidoetil)amina (P3) e N,N,N',N'-tetrakis(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)etilenodiamina (P6).....	79
Figura 61: Espectro na região do IV de PA (acima) e P3 (abaixo).....	80
Figura 62: Espectro na região do IV de P6.....	81
Figura 63: Espectro de RMN de $^1H$ de P3.....	82
Figura 64: Espectro de RMN de $^1H$ de P6 ( $D_2O$ ).....	82
Figura 65: Espectro de RMN $^{13}C$ de P3 ( $D_2O$ ) .....	83
Figura 66: Espectro de RMN $^{13}C$ de P6 (DMSO).....	84
Figura 67: DEPT de P3.....	85
Figura 68: DEPT de P6 (DMSO).....	85
Figura 69: N,N,N', N'- tetrakis (2-tioureidoetil)etilenodiamina (P4).....	86
Figura 70: Espectro na região do IV de P4.....	86
Figura 71: RMN $^1H$ de P4 em $D_2O$ .....	87
Figura 72: RMN $^{13}C$ de P4 em $D_2O$ .....	88
Figura 73: A presença do terceiro átomo de carbono da estrutura molecular de P4 foi confirmada pelo DEPT.....	88
Figura 74: Estrutura de N,N,N',N'-tetrakis(2-metil-tioureido-etil)etilenodiamina (P5).....	89

<b>Figura 75:</b> Espectro na região do IV de <b>P5</b> .....	89
<b>Figura 76:</b> Equilíbrio do grupo terminal metil-tioureido.....	90
<b>Figura 77:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de <b>P5</b> .....	90
<b>Figura 78:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de <b>P5</b> .....	91
<b>Figura 79:</b> DEPT de <b>P5</b> .....	91
<b>Figura 80:</b> 1,7-bis-(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)-4-tia-heptano ( <b>P7</b> ).....	92
<b>Figura 81:</b> Espectro na região do infravermelho de 1,7-bis-(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)-4-tia-heptano ( <b>P7</b> ).....	92
<b>Figura 82:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H em D <sub>2</sub> O.....	93
<b>Figura 83:</b> RMN <sup>13</sup> C de <b>P7</b> .....	94
<b>Figura 84:</b> DEPT de <b>P7</b> .....	94
<b>Figura 85:</b> Resultado do teste de ação fungicida.....	98
<b>Figura 86:</b> Estrutura geral dos compostos estudados em trabalhos anteriores .....	99
<b>Figura 87:</b> Correlação entre log <i>k<sub>w</sub></i> e <i>P<sub>oct</sub></i> para os padrões cromatográficos.....	112
<b>Figura 88:</b> Placa de elisa utilizada para teste em microdiluição.....	113
<b>Figura 89:</b> Redução do MTT e do XTT a formazana.....	117

#### Tabela de esquemas

<b>Esquema 1:</b> Mecanismo geral de preparação de derivados tioureidos com tioureia.....	69
<b>Esquema 2:</b> Mecanismo geral de preparação dos haletos de alquila desta dissertação .....	70
<b>Esquema 3:</b> Diluição seriada das amostras .....	115
<b>Esquema 4:</b> Placa de petri subcultivada em duplicata para diferentes concentrações em µg/mL.....	116

\

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ : Ângulo entre Ligações

$\sigma$ : Constante de Hammett

$\pi$ : Constante Lipofílica

$\Delta$ : Contribuição Polar

$\delta$ : Deslocamento Químico em ppm

$\rho$ : Parâmetros eletrônicos

$\Delta G_R$ : Variação da Energia Livre de Gibbs para a Retenção

[MeOH]: Porcentagem de metanol vol/vol

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

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

$\text{\AA}$  = Angstrom ( $10^{-9}$ )

$a_0, a_1, a_2$ : Constantes obtidas a partir do método do *least squares*

A:T, G:C: Pares de Bases Nitrogenadas (Adenina: Timina, Guanina: Citosina)

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome

ARPI: *Antimicrobial Resistance Prevention Initiative*

ASD: Agar Sabouraud Dextrose

ATCC: American Type Culture Collection

C: Concentração Molar

CBM: Cromobalastomicose

CCD: Cromatografia de Camada Delgada

CFM: Concentração Fungicida Mínima

*cis*-Pt: *cis*-Platina

D: Dendrímeros

d: Duplete

DE<sub>50</sub>: Dose efetiva

DEPT: Transferência de Polarização Acentuada sem Distorção

DIEs: Doenças Infecciosas Emergentes

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

DNA: Deoxyribonucleic Acid

IFIs: Infecções Fúngicas Invasivas

ITC: *“Isothermal Titration Calorimetry”*

IV: Espectrometria na Região do Infravermelho

$J^n$ : Constante de Acoplamento

k: Fator de Capacidade

$K_1$ ,  $K_{-1}$ ,  $k_2$ ,  $k_{-2}$ ,  $K_R$ : Constantes de equilíbrio

LASELORG-QUIM: Laboratório de Síntese e Eletrossíntese Orgânica e Química Medicinal

LD50: Dose Letal

log P: Coeficiente de Partição

LY214352: 8-cloro-4-(2-cloro-4-fluorofenoxi)quinolina

MGBs: *Minor groove binders*

MIC: Concentração Inibitória Mínima

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

NC: Núcleo Central

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

NCE: “*New Chemical Entity*”

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCA: Análise de Componentes Principais (“*Principal Component Analysis*”)

PD: Precursor Dendrimérico

PF: Ponto de fusão

pKa: Logaritmo da constante de acidez

ppm: Partes por Milhão

py: Piridina

q = quarteto

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

R: Constante dos gases

$r_f$ : Fator de Retenção

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

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

RP-HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase Reversa

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

s: singleto

spp.: Várias espécies

T: Temperatura absoluta

t: Tripleto

$t_0$ : Tempo de Retenção da Fase Móvel

TMS: Tetrametilsilano

$t_r$ : Tempo de Retenção do Solute Retido

V : Fator Estérico

VDP: Voltametria por Pulso Diferencial

vol/vol: Volume por Volume



X1: Flexibilidade Molecular

X2: Índice Topológico de Balaban

X3: Coeficiente de Partição ou log P

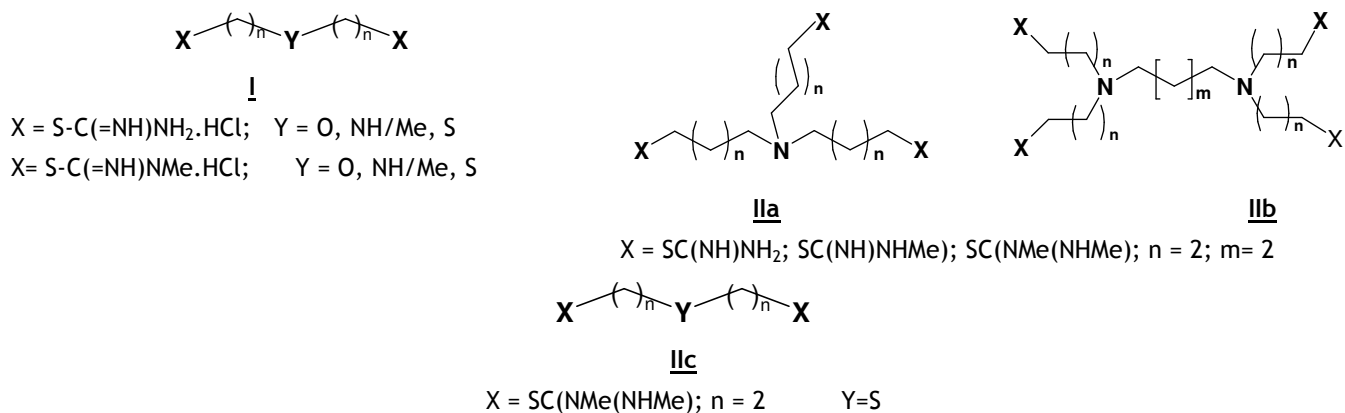
$\varphi$ : Composição da Fase Móvel

## APRESENTAÇÃO

No presente trabalho são apresentados os resultados obtidos no laboratório do **LASELORG-QUIM** (Laboratório de Síntese, Eletrossíntese Orgânica e Química Medicinal) durante a realização das atividades de pesquisas no Mestrado entre o período de Agosto de 2006 a Junho de 2008. Este trabalho está inserido no projeto de pesquisa inter- e trans-institucional - entre o Departamento de Química-ICEX/UFMG e os Departamentos de Microbiologia, Farmacologia e Bioquímica-ICB/UFMG intitulado “*Síntese de novos compostos com Atividade Antitumoral e Antimicrobiana para Doenças Infecciosas Emergentes (DIEs)*” - fomentado pela FAPEMIG (Proc. CEX 817/06) que visa à pesquisa inter-, multi- e trans-disciplinar (Química, Farmacologia, Micologia, Microbiologia e Bioquímica) para o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos para câncer e para o tratamento de doenças infecciosas emergentes (DIEs) ou infecções fúngicas invasivas (IFIs), problemas de saúde pública com grande relevância nos últimos tempos.

Em trabalhos anteriores que se basearam no estudo de compostos do tipo bis-funcionalizados por grupos tioureido (I) foram pesquisados tanto a avaliação da interação destas moléculas com o DNA como a inibição fúngica contra candidíase. A influência da lipofilia foi constatada, por estudos de QSAR (Relações Quantitativas Estrutura-Atividade), o que nos levou, no presente trabalho, a estudar outras classes de compostos com maior grau de alquilação, maior nível de ramificação (tris- e tetra-substituídos) e com outros bioisósteros (II).

Assim, neste projeto de Mestrado, sintetizaram-se novos precursores dendriméricos bis-, tris- e tetra-funcionalizados (IIa e IIb). Os compostos sintetizados são referentes a moléculas simétricas de tioéteres e aminas do tipo “*dendrons*” funcionalizadas com grupos específicos, como a seguir: S-tioureido, N-metil-S-tioureido e N,N-dimetil-S-tioureido (aminas trifuncionalizadas e tetra funcionalizadas, quase todas inéditas); além destas aminas, o sulfeto bis-funcionalizado, inédito, N-dimetiltioureido (IIc) foi preparado. A lipofilia também foi avaliada através do estudo do coeficiente de partição e investigou-se a atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *Criptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae*.



Nesta Dissertação de Mestrado, devido à multi-disciplinaridade desta pesquisa, para melhor contextualização geral, no capítulo de Introdução serão abordados os principais tópicos relacionados, tais como: o desenvolvimento de fármacos desde o randômico até a modificação molecular por bioisosterismo, abordando os fatores que influenciam no planejamento racional de um fármaco: lipofilia, rigidez, flexibilidade, alteração de substituintes e relações quantitativas estrutura-atividade; em seguida, também se contextualiza a importância dos graves problemas de saúde pública como o das neoplasias (ou câncer) - especialmente relatando os compostos que interagem com o DNA - e o das doenças infecciosas emergentes (DIEs) e infecções fúngicas invasivas (IFIs); ao final deste capítulo, abordaremos uma breve discussão sobre dendrímeros e precursores dendriméricos.

No segundo capítulo mostraremos a justificativa e a relevância do trabalho e os objetivos são mostrados no terceiro capítulo. No quarto capítulo, apresentaremos as discussões dos resultados obtidos:

- Preparação, caracterização espectrométrica e respectivos espectros dos precursores dendriméricos (P1 a P7);
- Estudos de lipofilia, através da medição do logaritmo de partição ( $\log P$ ) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC);
- Estudos de atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*.
- Estudos de atividade antitumoral contra algumas linhagens: adenocarcinoma gástrico humano (AGS), carcinoma de cólon murino (CT26WT), carcinoma mamário humano (MCF-7) e glioma de rato (C6).

No quinto capítulo, apresentaremos a parte experimental dos estudos efetuados e dos resultados apresentados.

Finalmente, no sexto capítulo concluiremos de maneira geral os resultados apresentados até então e as perspectivas futuras com tais resultados.

## RESUMO

A presente dissertação apresenta os resultados obtidos a partir do estudo de sete derivados funcionalizados bis-, tris- e tetra-substituídos com os quais se analisou o efeito da variação da ramificação na cadeia e do grau de metilação. Cabe ressaltar que todos os compostos são simétricos, similares a precursores dendriméricos (ou “dendrons”) e foram nomeados genericamente como **P**. A atividade biológica destes compostos foi investigada contra fungos patogênicos do gênero *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae*. O estudo da atividade citotóxica contra algumas linhagens tumorais é também descrito.

Seis derivados análogos às mostardas nitrogenadas, pela substituição nas extremidades  $\omega, \omega'$ -bis-S-tioureido substituídos com diferentes graus de ramificação e diferentes graus de metilação no grupo tioureido, foram sintetizados e estudados: tri(2-tioureidoetil)amina (**P1**), tri(2-(1-metil-2-tioureidoetil)amina (**P2**), tri(2-(1,3-dimetil)-tioureidoetil)amina (**P3**), N,N,N',N'-tetrakis(2-tioureidoetil)etilenodi-amina(**P4**), N,N,N',N'-tetrakis(2-metil-tioureido-etil)etilenodi-amina(**P5**) e N,N,N',N'-tetrakis(2-1,3-dimetil-tioureido-etil) etileno -diamina (**P6**). Todos estes tioureido-amino derivados são inéditos com exceção de **P1** que já foi testado contra leucemia. Um análogo tipo tio-éter também foi preparado: 1,7-bis-(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)-4-tia-heptano (**P7**). Todos estes compostos foram caracterizados pelos métodos espectrométricos usuais (Infravermelho, RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ).

O derivado tri-ramificado e não-metilado **P1** foi o agente antifúngico mais potente mostrando atividade em baixas concentrações contra *C. albicans* e *C. glabrata*, podendo ser potencialmente um agente de uso tópico para tratamento de candidose. Os derivados tipo tioureido **P3** e **P6** apresentaram amplo espectro de ação antifúngica contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. neoformans* e *S. cerevisiae*. **P5** foi ativo somente contra *C. glabrata* (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e, **P6** foi ativo contra *C. glabrata* (125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), mas, notoriamente, junto com **P7** - o sulfeto bis-N,N-dimethyl funcionalizado - foram os únicos agentes antifúngicos eficientes na inibição de *C. parapsilosis* (125 e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). É digno de nota que **P7** também mostrou amplo espectro de ação inibindo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. neoformans* e *S. cerevisiae*.

Os derivados **P2** - tri-ramificado e monometilado - tanto quanto **P4** - derivado tetra-ramificado e não-metilado - não se mostraram ativos contra as espécies investigadas. Seria esperado que **P4** fosse mais ativo e talvez isto seja devido ao fato da ocorrência de interações tipo ligação de hidrogênio muito fortes entre o átomo de nitrogênio e os hidrogênios de dois grupos tioureido diferentes, o que foi notado pela observação detalhada do espectro na região do infravermelho. De fato, tais interações intramoleculares são muito favoráveis em compostos assim, como **P4**, com baixo nível de alquilação, alta polaridade e alta simetria, pois **P4** possui dois pares de ligações N-H para fazer ligações de hidrogênio intramoleculares. Assim, se os grupos tioureido estão envolvidos em fortes interações intramoleculares não há disponibilidade para a interação biológica necessária para a atividade antifúngica.

**P1** e **P2** foram também testados contra espécies tumorais: adenocarcinoma gástrico humano (AGS), carcinoma de cólon murino (CT26WT), carcinoma mamário humano (MCF-7) e

glioma de rato (C6) - porém, a faixa de concentração inibitória para 50% -  $10^{-4}$  to  $10^{-5}$  mol/L - não é boa o suficiente para tornar estas moléculas promissoras como agentes antineoplásicos.

Os estudos para avaliação da lipofilia através de medidas em RP-HPLC também são descritas e os resultados mostraram que a padronização usual com compostos comuns e com coeficientes de partição conhecidos não são adequados para o presente estudo que lida com moléculas mais ramificadas e polifuncionalizadas. As metodologias de cromatografia de camada delgada e “shake-flask” podem ser alternativas viáveis e estão sendo testadas.

## SUMMARY

The present dissertation presents the results obtained from synthesis of seven bis-, tri- and tetrabranched functionalized derivatives, the influence of the branching, the methylation levels at the nitrogen atoms of the thioureido moiety, on the antifungal activity was investigated. All compounds are symmetrical and similar to dendrimeric precursors or “*dendrons*” and they are named as **P**. The investigation of biological activity against pathogenic fungi from gender *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* and *Saccharomyces cerevisiae* are reported. The cytotoxic studies against several tumoral species are also described.

Six  $\omega,\omega'$ -bis-S-thioureido substituted nitrogen mustard analogues with different nitrogen methylation levels at thioureido moiety, were synthesized and studied: tri(2-thioureidoethyl)amine (**P1**), tri(2-(1-methyl-2-thioureidoethyl)amine (**P2**), tri(2-(1,3-dimethyl-thioureidoethyl)amine (**P3**), N,N,N',N'- tetrakis (2-thioureidoethyl)ethylenediamine (**P4**), N,N,N',N'-tetrakis(2-methyl-thioureido-ethyl)ethylenediamine (**P5**) and N,N,N',N'-tetrakis(2-1,3-dimethyl-thioureido-ethyl)ethylene-diamine (**P6**). All of them are novel, but not **P1**, ever prepared and studied against leukemia. One novel thio-ether analogue was also prepared: 1,7-bis-(2-1,3-dimethyl-thioureido-ethyl)-4-thia-heptano (**P7**). All prepared substances were characterized by spectrometric methods (Infrared,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  -NMR).

The tribranched and non-methylated derivative **P1** was the most active antifungal agent showing activity in very low concentrations against *C. albicans* and *C. glabrata*. **P1** might be potentially used as topical agent for the treatment of candidosis. The other thioureido derivatives **P3** and **P6** showed broad-spectrum of antifungal activity against *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. neoformans* and *S. cerevisiae*. **P5** was active only against *C. glabrata*. Remarkably, **P6** was active against *C. glabrata*, and such as **P6** and **P7** were the only agents enough efficient to inhibit *C. parapsilosis*. In fact, **P7** also showed broad-spectrum of antifungal activity inhibiting *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. neoformans* and *S. cerevisiae*.

The tri-branched and monomethylated amino analogue **P2** was inactive against all species tested, such as **P4**, the tetra-branched and non-methylated amino analogue. It was expected that **P4** would be more active than it really is and maybe this is due to the occurrence of intramolecular hydrogen bonds - between the nitrogen and the hydrogen atoms of two different thioureido groups - which were noticed only in the infrared spectra for **P4**. In fact, these intramolecular interactions are very favorable in compounds with low alkylation level, high polarity and high symmetry compounds such as **P4**, and besides **P4** has two pairs of nitrogen-hydrogen groups (NH) to make two mutual intramolecular hydrogen bond interactions. Therefore, if the thioureido groups are involved in very strong intramolecular interactions, there is no free thioureido group to make the biological interaction which is responsible for the antifungal activity.

P1 e P2 were also tested against some tumor species - human gastric adenocarcinome (AGS), murin colon carcinome (CT26WT), female mamarian human carcinome (MCF-7) and mouse glioma (C6) - but, the average found MIC -  $10^{-4}$  to  $10^{-5}$  mol/L - in not good enough to make these molecules promising novel antineoplastic agents.

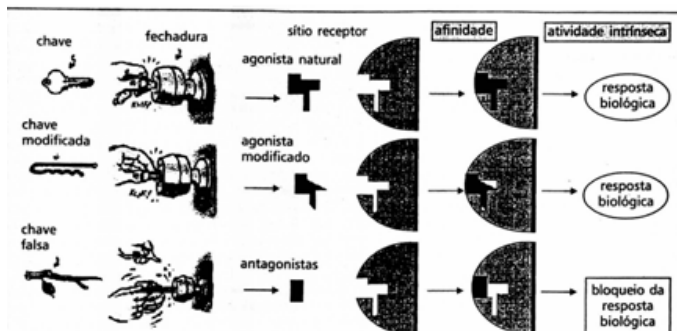
The attempts for their partition coefficient (log P) measurements by RP-HPLC technique are also described and the results show that the usual standardization with common and ordinary compounds with well-known partition coefficients is not suitable for the present studied with high branched and polifunctionalized molecules. The thin layer chromatography or even the usual “shake-flask” methodologies might be alternatives and they are going to be tested.

## I- INTRODUÇÃO

### ***I.1-Desenvolvimento de Fármacos: do Randômico ao Bioisosterismo, do Xamã ao Químico Medicinal***

Nos povos antigos, através do instinto primitivo inconsciente ou da indicação determinada de xamãs, encontrava-se alívio para o tratamento de doenças com o uso de produtos naturais, em uma procura a princípio “irracional”, mas que gerava alguns métodos terapêuticos eficientes. Com o passar do tempo, estes métodos foram transmitidos verbalmente por gerações até os “raizeiros” e com o desenvolvimento da ciência surgiram os cientistas especializados na área de produtos naturais no século XX. Assim, foi descoberto que naqueles medicamentos primitivos havia a presença de compostos químicos específicos e estes seriam os agentes responsáveis pelo tratamento, os fármacos (do grego, *pharmakon* = droga ou medicamento, ou veneno, ou beberagem mágica).

Paracelsus (1493-1541) contribuiu significativamente para o nascimento da Farmacologia no final da Idade Média, afirmando que cada doença deveria ser tratada por um tipo de medicamento e que a dose certa define se uma substância química é um medicamento ou um veneno<sup>1</sup>. Contudo, o cientista considerado o responsável pelo nascimento da quimioterapia, Paul Ehrlich (1854-1915, ganhador do Prêmio Nobel de Medicina em 1908), exaltava a importância do uso de compostos químicos para tratamento de doenças na famosa citação que relatava: “o uso de fármacos para combater um organismo invasor sem prejudicar o hospedeiro” iniciando-se o pioneirismo no tratamento farmacológico<sup>2</sup>. De fato, Ehrlich notara durante o seu doutoramento que compostos específicos, ou mais especificamente corantes químicos, interagiam com tecidos ou células específicas o que fez sugerir que há uma determinada afinidade que poderia levar ao desenvolvimento sonhado de “*magic bullets*”, ou seja, medicamentos muito eficientes que atingiriam seletivamente a doença, curando-a completamente. Ehrlich já acreditava na importância da estrutura molecular de compostos com atividade farmacológica nos processos biológicos e que estes fármacos teriam que interagir com os compostos químicos celulares para a ocorrência do processo terapêutico. Com a evolução deste conceito, chegou-se ao desenvolvimento da “Teoria da Chave-Fechadura”, como hoje é conhecida (Figura 1). Nesta teoria os compostos químicos (“chaves”) conduzem a uma interação com o sistema bioquímico humano ou com o sistema do patógeno invasor (“fechaduras”) e o citado composto pode gerar ou bloquear a atividade biológica considerada e no caso da doença, esta ou ao menos os sintomas desta, seriam tratados<sup>1,2</sup>.



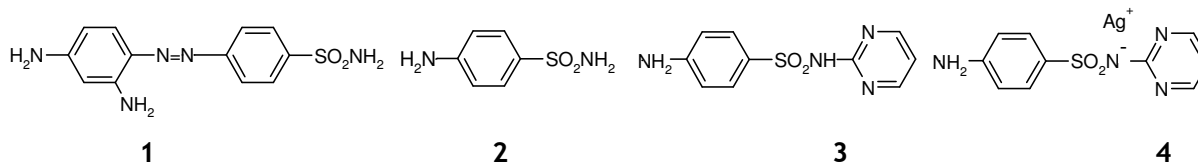
**Figura 1:** Representação esquemática da teoria chave-fechadura.

<sup>1</sup> Kremers, E.; Urdang, G. History of Pharmacy, J. P. USA, Lippincott Company, 1951.

<sup>2</sup> Riethmiller, S., *Bull. Hist. Chem.*, 1999, 23, 28.



Com o passar do tempo estabeleceu-se, de fato, um conceito preliminar de similaridade química e já se pressupunha que estruturas moleculares similares devem apresentar atividade farmacológica similar<sup>3</sup>. Um exemplo clássico de descoberta de fármacos é o das sulfas<sup>4</sup>, cuja atividade antibacteriana foi primeiramente descrita e comprovada, para a *para*-sulfamidocrisoidina (1, Prontosil Rubrum®, Figura 2), pelo patologista e bacteriologista alemão Gerhardt Domagk (ganhador do Prêmio Nobel de Medicina em 1938). Entretanto, Forneau e colaboradores<sup>4</sup> descobriram, pela análise dos metabólitos no sangue e urina de pacientes em tratamento com Prontosil®, a presença de sulfanilamida, ou astromicida (2, Figura 2), substância conhecida desde 1908. Assim, concluiu-se que a parte responsável pela bioatividade da molécula (hoje chamada de **farmacóforo**) era a sulfanilamida e que os vários quimioterápicos antibacterianos até então bem conhecidos, somente agiam devido à presença do grupo farmacofórico sulfonamídico. A partir desta época, com o conceito de **modificação molecular** ganhando espaço na ciência, outras substâncias antimicrobianas derivadas da sulfa - considerada como **composto-protótipo** - surgiram. Como por exemplo, em 1940, as sulfas substituídas com núcleos pirimidínicos, dentre elas a sulfadiazina (3, Figura 2). As sulfas pirimidínicas foram utilizadas no combate contra infecções causadas por *cocos* e *colibacilos*. O sal de prata da sulfadiazina (4, Figura 2) foi introduzido na prática médica por Fox e colaboradores em 1968<sup>5</sup>, e é ainda hoje um medicamento tópico útil para o tratamento de queimaduras e úlceras varicosas, por proporcionar cicatrização rápida.



**Figura 2:** Estrutura de algumas sulfas com atividade antibacteriana.

Assim, muito resumidamente, podem-se realizar modificações moleculares através da mudança na estrutura de um composto-protótipo, que exibe determinada atividade farmacológica, no sentido de aumentar a potência da atividade biológica estudada e quem sabe aumentar a seletividade e, assim, diminuir a toxicidade.

As alterações estruturais específicas, que podem ser efetuadas, podem ser classificadas como: (1) a dimensão e a conformação do esqueleto de carbono, (2) a natureza e o grau de substituição e (3) a estereoquímica da molécula. Tais alterações influenciam na atividade do

<sup>3</sup> Eckert e Bajorath, *Drug discovery today*, 2007, 12(5/6), 225-233.

<sup>4</sup> Hardman J. G.; Limbird L. E.; Goodman and Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, versão em CD-ROM, 9a ed., McGraw-Hill: New York, 1996; Mitscher, L. A. Em Foye's *Principles of Medicinal Chemistry*; Williams, D. A.; Lemke, T. L., eds.; 5ª ed., Lippincott Williams and Wilkins: Baltimore, 2002, cap. 34. Gelmo, P., *J. Prakt. Chem.* 1908, 77, 369. Buttle, G. A. H.; Gray, W. H.; Stephenson, D. *Lancet* 1936, 1, 1286.

<sup>5</sup> Fox, C. L., *Arch. Surg.*, 1968, 96, 184. Fox, C. L.; Rappole, B. W.; Stanford, W., *Surg. Gynecol. Obst. Int. Abstr. Surg.*, 1969, 128, 1021.

composto, alterando as características moleculares, entre as principais é possível destacar: grau de lipofilia, rigidez, tamanho e grupo funcional e que serão descritas a seguir.

### **I.1.a-FATORES QUE INFLUENCIAM A ATIVIDADE DE UM COMPOSTO-PROTÓTIPO- TIPOS DE MODIFICAÇÃO MOLECULAR**

#### **I.1.a.1-Lipofilia:**

A lipofilia (do grego, como já citado, *lipo* = gorduroso, oleoso, *phylis* = afinidade; em inglês: “*lipofilarity*” ou “*lipophilicity*”) é uma característica físico-química usualmente dada a substâncias que possuem algum tipo de afinidade com ambientes orgânicos apolares, mas que pode ser matematicamente definida como o logaritmo do coeficiente de partição (log P)<sup>6</sup>. A lipofilia pode ser expressa quantitativamente pelo coeficiente de partição<sup>8-10</sup> que pode ser definido como o logaritmo da concentração de equilíbrio de espécies monoméricas de um composto na fase orgânica, dividido pela concentração da mesma espécie na forma neutra, presente na fase aquosa.

$$\log P = \log [\text{composto}]_{\text{org}} / [\text{composto}]_{\text{água}}$$

Assim, algumas vezes utiliza-se o aumento da cadeia de metileno com a finalidade de aumentar a lipofilia (Tabela 1). Quanto maior o valor de P maior o grau de lipofilia do composto. Como exemplo, os coeficientes de partição do benzeno e do tolueno foram medidos utilizando o sistema n-octanol/água e os valores de P dos demais foram medidos a partir do sistema azeite/água<sup>7</sup>. Na verdade, em relação a fármacos, o aumento da lipofilia pode possibilitar maior penetração do composto pelas membranas celulares.

**Tabela 1:** Dados de coeficiente de partição (log P e de P) de alguns compostos devido à introdução de grupamentos metila.

Composto	Estrutura	Log P - P	Análogo	Estrutura	LogP - P
Benzeno	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	2,13 - 135	Tolueno	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	2,69- 490
Acetamida	CH <sub>3</sub> CONH <sub>2</sub>	1,92 - 83	Propionamida	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	2,56 - 360
Uréia	NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub>	1,18 - 15	N-metiluréia	CH <sub>3</sub> NHCONH <sub>2</sub>	1, 64 - 44

A lipofilia tem sido o parâmetro físico-químico mais estudado com relação à sua influência sobre a atividade biológica<sup>8</sup>, pois a maior lipofilia do fármaco deve aumentar a lipossolubilidade e

<sup>6</sup> Sant’Anna, C. M. R., *Quim. Nova*, 2002, 25(3), 505-512.

<sup>7</sup> Thomas, G. *Química medicinal: Uma introdução*. Rio de Janeiro 2003, Editora Guanabara. Tradução: Franklin David Rumjanek (Medicinal Chemistry An Introduction, 2000. John Wiley & Sons, Ltd.) Cap. 1.

<sup>8</sup> Leo, A.; Hansch C.; Elkins D., *Chem. Rev.*, 1971, 71, 525. Helmer, F.; Kiers, K.; Hansch C., *Biochemistry*, 1968, 7, 2858. Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. Londres 1996, Academic Press, pp.676. Tute, M. S. *History and Objectives of Quantitative Drug Design*. Em Hansch, C.; Sammes, P. G.; Taylor, J. B. *Comprehensive Medicinal Chemistry, Quantitative Drug Design*, vol.4. Nova Iorque 1990, pp. 1-31. Khalili, P.; Naimi, E.; Sun, W. Y.; Knaus, E. E.; Wiebe, L. I., *Eur. J. of Pharm. Sci.* 2003, 19, 305. Vrakas,

a permeabilidade celular. Entretanto, a lipofilia pode ser avaliada e quantificada a partir da medida do coeficiente de partição pode ser efetuada de três diferentes metodologias: a) por medida direta (exemplo mais comum: o método “*shake-flask*”), b) por cálculos teóricos/ métodos computacionais e c) por medida indireta (metodologia mais comum: métodos cromatográficos). Experimentalmente, já se ressalta aqui o uso de coeficientes de partição (**log P**) obtidos do sistema de partição octanol/água que se tornou um modelo padrão para quantificar a lipofilia dos compostos.

O método conhecido como “*shake-flask*” constituiu o primeiro e também o mais usado método experimental para determinação do coeficiente de partição e consiste na determinação da concentração de um determinado composto (através um método analítico) distribuído em uma mistura bifásica de solventes. Porém, apesar de ser considerado padrão na determinação de log P, ele apresenta diversos inconvenientes, entre os quais: elevado tempo para experimento, necessidade de pré-saturação, dificuldade de determinação de log P maior que quatro, formação de micelas e emulsões na fase aquosa, etc. Cabe ressaltar que o uso de coeficientes de partição (log P) obtidos do sistema de partição octanol/água tornou-se um modelo padrão para quantificar a lipofilia dos compostos e mimetizar membranas biológicas.<sup>9</sup>

Parâmetros obtidos através de métodos cromatográficos (cromatografia líquida, em camada delgada ou em papel), também podem fornecer informações quantitativas sobre a lipofilia das moléculas. Tais parâmetros já foram investigados por vários autores sob diversos aspectos, envolvendo a discussão sobre a exatidão de suas medidas, aspectos termodinâmicos e a maneira como podem ser relacionados teórica e experimentalmente com a energia livre de outros parâmetros. Estes parâmetros obtidos cromatograficamente têm uma larga aplicabilidade em estudos de relação estrutura-atividade.<sup>9</sup> Realmente, as técnicas cromatográficas têm sido muito úteis neste campo, fornecendo parâmetros lipofílicos de grande importância em estudos para o desenvolvimento de novos fármacos.<sup>9</sup>

Cabe destacar, porém, que apesar da grande aplicação do uso da medida experimental do coeficiente de partição, alguns autores consideram que a lipofilia de uma molécula pode ser medida estruturalmente como uma composição de dois fatores, nomeados como estérico (**V**) e de contribuição polar (**Λ**), sendo que o volume molar pode ser calculado (**V**) e o fator da polaridade pode ser obtido indiretamente de medidas de log P, sendo que  $\Lambda = 0$  para compostos apolares, especialmente sem ligações de hidrogênio<sup>8</sup>.

$$\text{Log P} = a \text{ V} - \Lambda$$

---

D., Tsantili-Kakoulidou, A., *Pharmaceutike*, 2004, 17, 83. Valko, K., *J. Chromatogr.*, 2004, 1037, 299. Markuszewski, M. J.; Wiczling, P., *Comb. Chem. High Throughput Screening*, 2004, 7, 281. Nasal, A.; Siluk, D.; Kaliszan, R., *Curr. Med. Chem.*, 2003, 10, 381. Kubinyi, H. *QSAR Des. Bioact. Compd.*, 1984, 5, 321. Kubinyi, H. *Progr. Drug Res.*, 1979, 23, 97. Kubinyi, H. *Farmaco, Ediz. Scient.* 1979, 34, 248. Kubinyi, H., *J. Pharmac. Sci.*, 1978, 67, 262. Kubinyi, H., *J. Med. Chem.*, 1977, 20, 625. Nogueira, L. J.; Donnici, C.L., Montanari, C.A.; Cass, Q. B.; Jardim, I. J. *Ciência Hoje*, 2008, 249, 40-44.

<sup>9</sup> Pliska, V.; Testa, B.; van der Waterbeemd, H.; *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*. Em: *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*; Manhold, R.; Kubinyi, H.; van der Waterbeemd, H., eds; vol. 4, Alemanha, VCH, 1997. Tavares, L. C. *Quim. Nova*, 2004, 27, 63. Leo, A.; Hansch, C., *Perspect. Drug Discovery Des.* 1999, 17, 1. Tomlinson, E., *J. Chromatogr.* 1975, 113, 1. Pyka, A.; Miszczyk, M., *Chromatographia*, 2005, 61, 37; Kaliszan R., *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2004, 7, 281. Klopman, G.; Zhu, H., *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2005, 5, 127.

Contudo, divergências a parte, a lipofilia é atualmente, e de fato, um parâmetro de fundamental influência para a investigação da biodisponibilidade, permeabilidade e até toxicidade de fármacos; por exemplo, a influência da lipofilia já foi estudada com relação às mais variadas atividades farmacológicas, tais como: antifúngicas<sup>10</sup>, anti-plaquetárias<sup>11</sup>, anti-inflamatórias<sup>12</sup>, anti-câncer<sup>13</sup>, anti-virais<sup>14</sup>, anti-convulsivantes<sup>15</sup>, analgésicas<sup>16</sup> e beta-bloqueadoras<sup>17</sup>.

Além disso, a importância da lipofilia no desenvolvimento de fármacos tem sido muito valorizada não só dentro dos meios acadêmicos, mas principalmente dentro da indústria farmacêutica. Um pesquisador da Pfizer chamado Christopher A. Lipinski chegou a estabelecer uma polêmica regra geral para o planejamento de fármacos, relatada oralmente em 1995, que é conhecida como “regra de Lipinski” (“Lipinski rule”) ou “regra de cinco” (“five’s rule” ou “rule of five”);<sup>18</sup> este nome é adotado porque cada um dos quatro parâmetros envolvidos usam valores que são múltiplos do número 5. Nesta regra o autor postula que, considerando-se as centenas de fármacos estudados, a baixa atividade farmacológica devida à sua baixa absorção e permeabilidade ocorre quando: (1) há mais do que 5 centros doadores de ligação de hidrogênio, (2) há mais do que 10 aceptores de ligações de hidrogênio, (3) o peso molecular é maior do que 500 unidades e (4) o log P calculado é maior do que 5. Assim, por exemplo, dentro dos fármacos estudados e em uso clínico nos EUA: (1) menos de 12% deles possuem em sua estrutura mais do que 10 átomos de oxigênio ou nitrogênio (aceptores de ligação de hidrogênio); (2) 8% possuem a soma acima de 5 grupos OH e NH (doadores de ligação de hidrogênio); (3) 11% deles tem massa molecular maior do que 500 unidades e finalmente (5) menos de 10% deles tinha log P maior do que 5. É digno de nota que há, contudo, algumas classes de fármacos que não seguem esta regra. De qualquer forma, esta análise geral feita por Lipinski é considerada de grande relevância e importância e evidencia a importância da lipofilia na atividade farmacológica e no planejamento racional de qualquer fármaco<sup>39</sup>.

Porém, nem sempre o aumento da lipofilia incrementa a bioatividade, algumas vezes a adição de grupo metila também pode diminuir a atividade biológica como no caso do derivado metilado da isoniazida (ácido isonicotínico) (Figura 3) que apresenta atividade antibacteriana inferior<sup>19</sup>. O MIC (concentração inibitória mínima) da isoniazida é 1,1 µmol/L e o do ácido 2-metilisonicotínico é 5,2 µmol/L.

<sup>10</sup> Takahashi, J.; Kirino, O.; Takayama, C.; Kamoshita, K., *J. Chromatogr.*, 1988, 436, 316.

<sup>11</sup> Tanaka, A.; Nakamura, K.; Nakanishi, I.; Fujiwara, H., *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 4563.

<sup>12</sup> Takacs-Novak, K.; Avdeef, A.; Box, K. J.; Podanyi, B.; Szasz, G., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1994, 12, 1369. Barbato, F.; Caliendo, G.; La Rotonda, M. I.; Siliipo, C.; Toraldo, G.; Vittoria, A., *QSAR*, 1986, 5, 88.

<sup>13</sup> Kubinyi H., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1990, 116, 529.

<sup>14</sup> Khalili, P.; Naimi, E.; Sun, W. Y.; Knaus, E. E.; Wiebe, L. I., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2003, 19, 305

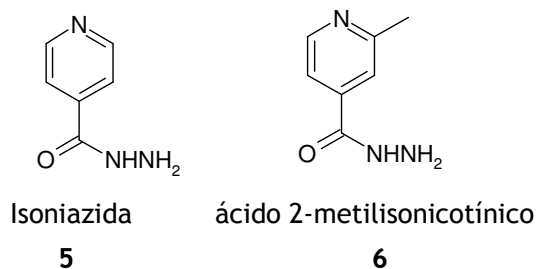
<sup>15</sup> Yamagami, Chisako; Takami, Hideko; Yamamoto, Kazuko; Miyoshi, Kyoko; Takao, Narao, *Chem. Pharm. Bull.*, 1984, 32, 4994.

<sup>16</sup> Preechagoon, D. Brereton, I.; Staatz, C.; Prankerd, R., *Int. J. Pharm.*, 1998, 163, 177.

<sup>17</sup> Gobburu, Jogarao V. S.; Shelver, William H., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1995, 84, 862.

<sup>18</sup> ACS Division of Medicinal Chem.'s *Chem. Eng. News* 2004, 82, 55. Hanson, D. *Chem. Eng. News* 2004, 83, 41. Oprea, T. I. *J. Computer-Aided Molec. Design*, 2000, 14, 251. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P., *J. Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 46, 3.

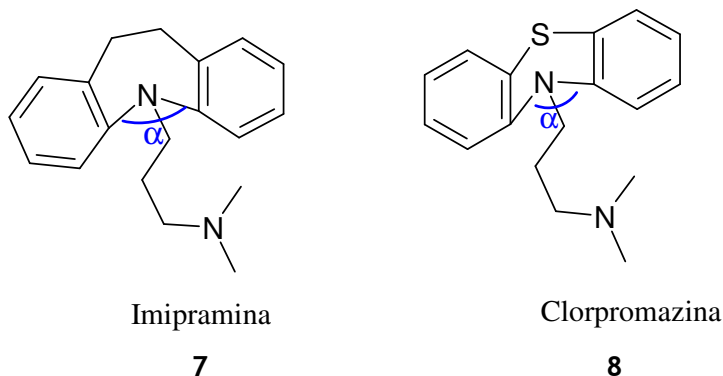
<sup>19</sup> Seydel, J.K. Schaper, K.; Wempe, E.; Cordes, H.P., *J. Med. Chem.*, 1976, 19 (4), 488-492.



**Figura 3:** Estruturas da isoniazida e ácido 2-metilisonicotínico.

### I.1.a.2-Rigidez x Flexibilidade

A interação fármaco-receptor pode ser influenciada pela alteração da rigidez ou da flexibilidade moleculares, pois se pode produzir um análogo com atividade diferente devido à conformação farmacofórica da molécula poder ser alterada e a interação ser diminuída ou impossibilitada. Isto é o que acontece, por exemplo, com clorpromazina (**8**, Figura 4) um bioisótero da imipramina (**7**, Figura 4), um antidepressivo que apresenta em sua geometria molecular um ângulo  $\alpha = 65^\circ$  entre os anéis aromáticos. No entanto, o bioisótero clorpromazina não apresenta tal atividade farmacológica, pois este apresenta  $\alpha = 25^\circ$ . O estudo de outros compostos análogos<sup>20</sup> tem mostrado que tal atividade pode ser comprovada em compostos que apresentem ângulos  $\alpha$  entre  $55^\circ$  à  $65^\circ$ .

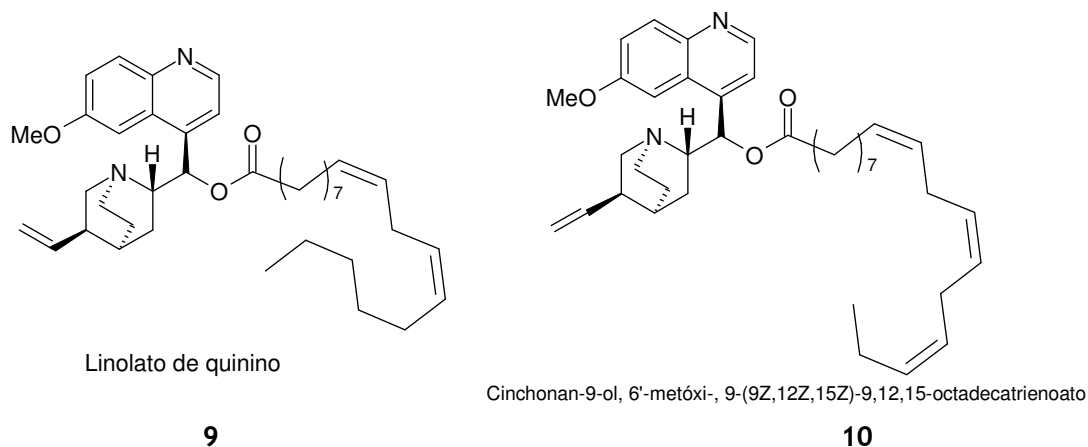


**Figura 4:** Estruturas da Imipramina ( $\alpha = 65^\circ$ , antidepressivo) e clorpromazina ( $\alpha = 25^\circ$ , neuroléptico).

Tem-se como outro exemplo, o aumento do número de ligações duplas que aumenta a rigidez da molécula, o que pode facilitar a interação entre o composto e os sítios receptores. Um caso a citar é o dos derivados de quinino (**9** e **10**, Figura 5), no qual ocorre o aumento da atividade anticancerígena do derivado octatrienoato em relação ao linolato de quinino<sup>21</sup>.

<sup>20</sup> Wilhelm, M., *Pharm. J.*, 1975, 214, 414-416.

<sup>21</sup> Kumura, Naokazu; Izumi, Minoru; Nakajima, Shuhei; Shimizu, Sakayu; Kim, Hye-Sook; Wataya, Yusuke; Baba, Naomichi. *Biosc. Biot. Bioch.* 2005, 69(11), 2250-2253.



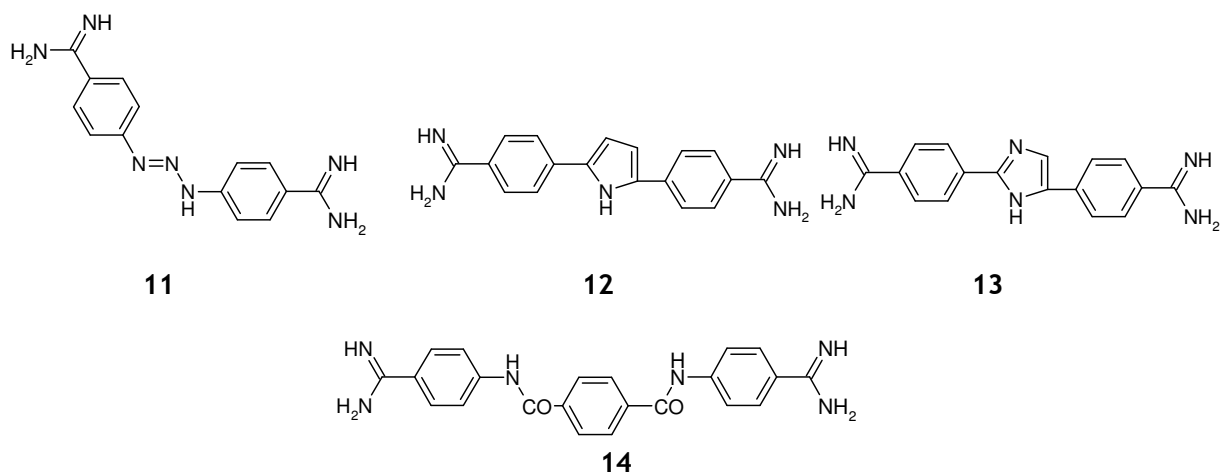
**Figura 5:** Linolato de Quinino e seu análogo octadecatrienato.

Contudo, compostos com mais ligações duplas são mais susceptíveis a oxidação metabólica, o que pode tornar o fármaco mais tóxico do que o protótipo.

### I.1.a.3-Tamanho do Análogo

O aumento do tamanho e da rigidez dos compostos pode ser efetuado pela introdução de anéis aromáticos, geralmente derivados de benzeno, ou pela introdução outros de sistemas heterocíclicos. Tal inserção pode tanto ampliar a capacidade de interação com o sítio-alvo quanto torná-la impossível. Além disso, a introdução de sistemas anelares pode aumentar a resistência do fármaco ao ataque enzimático devido ao impedimento estérico. A literatura traz uma série de compostos aromáticos e heteroaromáticos funcionalizados, por exemplo, por grupos amidínicos com atividade antimicrobiana<sup>22</sup>, dentre os quais trazemos os dados de Josef e col. (Figura 6) ilustrando a influência da modificação molecular sobre a potência. A atividade biológica depende da extensão da molécula, assim, o aumento do tamanho global da molécula pode potencializar a atividade biológica, preenchendo a fenda hidrofóbica em um sítio-alvo, ou pode alterá-la completamente (Figura 6).

<sup>22</sup> Anne, Jozef; De Clercq, Erik; Eyssen, Hendrik; Dann, Otto, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1980, 18(2), 231-9. Kondo, Shigeo; Maekawa, Kazuyuki. *J. Fac. Agric., Kyushu University* (1976), 20(2), 97-104. Fleig, Oskar; Windel, Hermann. (Badische Anilin- & Soda-Fabrik Akt.-Ges.) 1960, GB 840211. Hall, James Edwin; Kerrigan, John E.; Ramachandran, Kishore; Bender, Brendan C.; Stanko, Jason P.; Jones, Susan K.; Patrick, Donald A.; Tidwell, Richard R., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, 42(3), 666-674. Patrick, Donald A.; Hall, James Edwin; Bender, Brendan C.; McCurdy, Donald R.; Wilson, W. David; Tanius, Fariel A.; Saha, Shankar; Tidwell, Richard R., *Eur. J. Med. Chem.* 1999, 34(7/8), 575-583. Rahmathullah, Syed M.; Hall, James Edwin; Bender, Brendan C.; McCurdy, Donald R.; Tidwell, Richard R.; Boykin, David W., *J. Med. Chem.*, 1999, 42(19), 3994-4000.



**Figura 6:** Compostos aromáticos bis-amidínicos com atividade antimicrobiana: Berenil(11) e seus derivados: derivado pirrólico(12) com maior potência que o berenil, derivado imidazólico(13), menor potência, derivado tipo para-ftanilídico(14), menor potência.

#### I.1.a.4-Alteração dos Substituintes - Bioisosterismo

A forma mais usual e sistemática para formação de análogos se dá por modificação dos grupos funcionais da molécula. No início do século XX, foi introduzido um estudo de compostos contendo o mesmo número de átomos com o mesmo arranjo de elétrons, porém com diferentes átomos, o qual foi denominado isosterismo<sup>23</sup>. Mais tarde, este conceito foi ampliado por Erlenmeyer como sendo elementos, moléculas ou íons com arranjos periféricos de elétrons que poderiam ser considerados idênticos<sup>24</sup>. O termo bioisosterismo, adotado por Friedman<sup>25</sup> em 1952, foi utilizado para designação de compostos que não apenas apresentavam características físico-químicas semelhantes, como também semelhantes atividades biológicas.

A substituição bioisostérica segue a classificação de Burger<sup>26</sup>:

1- Bioisósteros clássicos: átomos e grupos monovalentes (F, OH, NH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, etc.), átomos e grupos divalentes (CH<sub>2</sub>, O, S, etc.), átomos e grupos trivalentes (CH, N, P, As, etc.) e átomos tetravalentes (C, Si, N<sup>+</sup>, P<sup>+</sup>, As<sup>+</sup>, etc.).

2- Bioisósteros não-clássicos: grupos interconversíveis (ou intercambiáveis) ((a) CO, CO<sub>2</sub>, SO, SO<sub>2</sub>NR, (b) COOH, SO<sub>3</sub>H, (c) H, F, OH, etc.)

Todavia, deve-se sempre considerar que o emprego bem adequado e previamente racionalizado da modificação bioisostérica deve antecipar, ou prever a influência destas alterações sobre as propriedades físico-químicas da molécula. Assim, como exemplo: a astromicida, ou sulfanilamida (**2**, Figura 7), um importante agente clínico inibidor da enzima

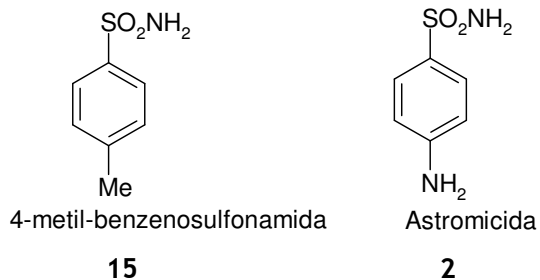
<sup>23</sup> Langmuir, I., *J. Am. Chem. Soc.*, 1919, 41, 1543-1559.

<sup>24</sup> Erlenmeyer, H., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, 30, 792-805.

<sup>25</sup> H. L. Friedman, 'Influence of Isosteric Replacements upon Biological Activity', National Academy of Sciences-National Research Council Publication No. 206. Washington 1951, pp. 295.

<sup>26</sup> Burger, A., *Pharm. Acta Helv.*, 1963, 38(10), 705-9.

carbonato hidrolase, quando modificada bioisostericamente no grupo amino pelo grupo metila, além do aumento da lipofilia também acarreta no aumento da atividade biológica.<sup>27</sup>



**Figura 7:** Estruturas da 4-metil-benzenosulfonamida e da astromicida

Assim, o bioisosterismo leva em conta uma série de fatores físico-químicos da substância, entre os quais, os principais já foram explicados acima. Tais parâmetros levam ao planejamento racional de fármacos e podem ser resumidos da seguinte maneira: (1) tamanho, volume e distribuição eletrônica do átomo, grau de hibridização, polarizabilidade, ângulos de ligação, efeitos indutivos e mesoméricos etc.; (2) lipofilia, pKa etc. (3) reatividade química, (objetivando prever as biotransformações inclusive na alteração de toxicidade dos metabólitos) etc.; (4) fatores conformacionais, possibilidade de ligações de hidrogênio inter- ou intramoleculares<sup>28</sup>.

Cabe aqui ressaltar que há um outro método de modificação molecular mais recente, o conhecido híbrido molecular que será somente relatado posteriormente junto à parte de antitumorais (item I.2).

#### I.1.a.5-Modificações Moleculares e Relações Quantitativas Estrutura-Atividade (QSAR)

A investigação mais importante quanto às modificações moleculares em compostos-protótipo com atividade biológica comprovada é o estudo da influência desta alteração através de relações estrutura química-atividade farmacológica (SAR - “*Structure-Activity Relation Ships*”) levando-se em conta não apenas as atividades dos compostos análogos com estruturas semelhantes, como também as alterações acarretadas nas propriedades físico-químicas dos compostos estudados e como estas alterações influenciam a química e a atividade farmacológica. O estudo quantitativo da atividade farmacológica (QSAR - “*Quantitative Structure-Activity Relation Ships*”) só se tornou possível com o desenvolvimento da ciência na área de conhecimento da estrutura molecular e na possibilidade da quantificação destas correlações entre estrutura e atividade. Em 1964 surgiu a primeira expressão quantitativa significativa da relação entre estrutura química e atividade farmacológica com os estudos de Corwin Hansch e Toshio Fujita<sup>29, 30</sup> que comprovaram a

<sup>27</sup> Jaiswal, Mona; Khadikar, Padmakar V.; Supuran, Claudiu T. *Bioorg. Med. Chem. Let.* 2004, 14(22), 5661-5666.

<sup>28</sup> Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. *Química Medicinal: as Bases Moleculares da Ação de Fármacos*. Porto Alegre 2001, Artmed ed, pp. 85-86.

<sup>29</sup> Hansch, C.; Fujita, T., *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86, 1616. Hansch, C.; Leo, A., *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. Nova Iorque 1979, Wiley. Hansch, C.; Steward, A. R.; Anderson, S. M.; Bentley D., *J. Med. Chem.*, 1968, 11, 1-11. Muir, Robert M.;



influência da lipofilia, e do coeficiente de partição octanol-água ( $\log P$ ) na atividade farmacológica. Isto ocorre devido ao processo de transporte de fármacos, pois vários efeitos biológicos do soluto, incluindo sua permeabilidade através da membrana celular que sofre um aumento ou redução em função de seus coeficientes de partição octanol/água. Com estes estudos de Hansch e Fujita é que realmente se iniciou a chamada nova era da Química Medicinal, a “ERA QSAR” e a partir dos trabalhos de Hansch várias correlações de sucesso envolvendo coeficientes de partição foram estabelecidas. Anteriormente até apareceram algumas tentativas<sup>31</sup> de tal correlação mas, sem os métodos matemáticos relevantes usados por Hansch e Fujita. Cabe destacar que usualmente a correlação entre a lipofilia e a atividade farmacológica geralmente exibe um comportamento parabólico<sup>32</sup> (Equação 1):

$$\text{Log } 1/C = a_0 + a_1 \log P + a_2 (\log P)^2 \quad \text{Equação 1}$$

Matematicamente, tal dependência parabólica entre  $\log P$  e algum tipo de atividade biológica medida através da concentração molar  $C$ , provocando uma resposta biológica padrão, tais como  $DE_{50}$  ou  $DL_{50}$ , pode ser obtida assumindo que a probabilidade de um fármaco atingir o sítio ativo é distribuída em relação ao  $\log P$ .

Entretanto, cabe ressaltar que Hansch e Fujita<sup>30-32,34</sup>, já em seus artigos pioneiros, avaliaram o reducionismo simplificador destas avaliações, e observaram que seria possível descrever diversos tipos de sistemas de correlação estrutura-atividade, no caso 5 (cinco) tipos na ordem relatada pelos autores: i) dependência linear entre o  $\log 1/C$  e  $\pi$  (constante lipofílica) ( $\log 1/C = a\pi + b$ ) observada na avaliação da citotoxicidade de ácidos benzóicos com larvas de mosquito e a atividade bactericida de fenóis contra *Micrococcus pyogenes var. aureus*; ii) ordem secundária de complexidade ( $\log 1/C = -a\pi^2 + b\pi + c$ ), como para a atividade de fenóis contra *Salmonella typhosa* e na atividade carcinogênica de dimetilaminobenzenos; iii) a lipofilia não apresenta maior importância, mas outros parâmetros como os eletrônicos ( $\rho$ ) ( $\log 1/C = \rho\sigma + c$ ) é que são influentes, como no caso da atividade inseticida de moléculas muito polares como os fósforo-ésteres fenílicos; iv) há influência mista entre lipofilia e efeitos eletrônicos ( $\log 1/C = a\pi + \rho\sigma + c$ ), como no estudo da atividade de inseticidas em mosca doméstica e de anestésicos locais; e v) situação de equação complexa tal como:  $\log 1/C = -k\pi^2 + k'\pi - k''\pi_0^2 + \rho\sigma + k'''$ , observada na atividade carcinogênica de hidrocarbonetos aromáticos e benzacridinas e no estudo da atividade tiroxínica de difenil-éteres diversos.

Fujita, T.; Hansch, C., *Plant Physiol.*, 1967, 42, 1519. Hansch, C., *Drug Dev. Res.*, 1981, 1, 267. Hansch, C., *Drug Infect. J.*, 1984, 18, 115. Craig, P. N., *Drug Infect. J.*, 1984, 18, 123. Hansch, C., *Acc. Chem. Res.*, 1993, 26, 147.

<sup>30</sup> Fujita, T.; Iwasa, J.; Hansch, C., *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, 86, 5175; Leo, A., Hansch C., Elkins D., *Chem. Rev.*, 1971, 71, 525. Helmer, F.; Kiers, K.; Hansch C., *Biochemistry*. 1968, 7, 2858.

<sup>31</sup> Tute, M.S.; *History and objectives of quantitative drug design* Em: Hansch, C.; Sammes, P. G. e Taylor, J. B. (Eds) *Comprehensive Medicinal Chemistr*, vol. 4, *Quantitative Drug Design*. Nova Iorque 1990, Pergamon Press, pp.1-31.

<sup>32</sup> Hansch, C; Steward, A. R.; Anderson, S. M.; Bentley, D. J., *J. Med. Chem.*, 1968, 11, 1-21. Flynn, G. L.; Yalkovsky, S. N., *J. Pharm. Sci.*, 1972, 61, 838-852. McCall, J. M., *J. Med. Chem.*, 1975, 18, 549-554. Shoenwald, R. D.; Huang, H. S., *J. Pharm. Sci.*, 1983, 72, 1266-1272. Hansch, C.; Clayton, J. M., *J. Pharm. Sci.*, 1973, 62, 1-21.

Atualmente, com o estudo sistemático e quantitativo da influência da alteração da estrutura química sobre propriedades físico-químicas dos fármacos em planejamento, não só a lipofilia. A ciência consegue o planejamento racional de novos fármacos a partir de relações estrutura-atividade biológica de forma sistemática, não ocorrendo mais a busca randômica, ou o achado ocasional (“*serendipity*”) de novos fármacos como na Antiguidade. Também não é mais necessário buscar novos derivados mais lipofílicos simplesmente pelo aumento da cadeia carbônica por homólogos superiores tipo “metil, etil, futil”, como diria um dos grandes especialistas desta área, Van der Waterbeemd<sup>33</sup>, no nome de um de seus artigos mais conhecidos e polêmicos.

Na história do desenvolvimento racional de fármacos destaca-se, em 1972, a descoberta - por um grupo de pesquisadores da empresa farmacêutica britânica SmithKline & French - da cimetidina (ou Tagamet®)<sup>34,37</sup> que é considerada como um marco na história da Química Medicinal (Figura 8)<sup>37</sup> e cuja molécula foi totalmente planejada, sintetizada e desenvolvida considerando-se as correlações entre as características físico-químicas, como a lipofilia dentre outras, e a estrutura molecular utilizando-se a modificação molecular com base no bioisosterismo (Figura 9). A cimetidina (24, Figura 9) foi o primeiro antagonista seletivo de receptores histamínicos, principalmente do subtipo 2, (H<sub>2</sub> antagonista - neuroreceptor responsável pela produção de secreção gástrica). Este fármaco vem sendo muito útil até hoje, na clínica médica para tratamento e prevenção de úlcera gástrica, além de ser o composto protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos da mesma classe.

O principal desafio de Robin Ganellin e colaboradores no planejamento molecular da cimetidina (24) era introduzir na estrutura de um protótipo atributos de seletividade a receptores de histamina do tipo H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>, sendo que este último receptor foi o principal alvo terapêutico. Como a topografia destes neuroreceptores não era conhecida, os pesquisadores decidiram adotar a histamina (tautômeros 16 e 17 - Figura 9), que é um agonista natural, como composto protótipo. A natureza imidazólica da histamina resulta em tautômeros, dependendo do tautômero predominante, a distância (d<sub>1</sub> ou d<sub>2</sub>) entre o grupo amino-terminal e o átomo de nitrogênio não hidrogenado no anel imidazólico varia, podendo ser um critério de reconhecimento molecular dos receptores H<sub>1</sub> ou H<sub>2</sub>. Modificando este composto protótipo, Ganellin observou que a metilação do sistema imidazólico modificava o equilíbrio tautomérico favorecendo a forma tautomérica 19, necessária à seletividade pelos receptores H<sub>2</sub>. A presença do grupo tioéter na cadeia lateral da cimetidina (24) impede o equilíbrio tautomérico do anel imidazólico e, além disso, assegura as propriedades hidrofóbicas adequadas para o fármaco. A função ciano-guanidina foi introduzida, na cadeia lateral, por sucessivas modificações na unidade N-aquil-uréia (20) → guanidina (21) → ureia-guanidina (22) → nitroguanidina (23). Apesar de esta última função ter fornecido um derivado extremamente ativo, com excelente seletividade e mesmo padrão tautomérico, este composto apresentou baixa solubilidade, com limitado índice de excreção e risco de danos renais, o que motivou a síntese da cimetidina (24), com função ciano-guanidina<sup>34, 35</sup>.

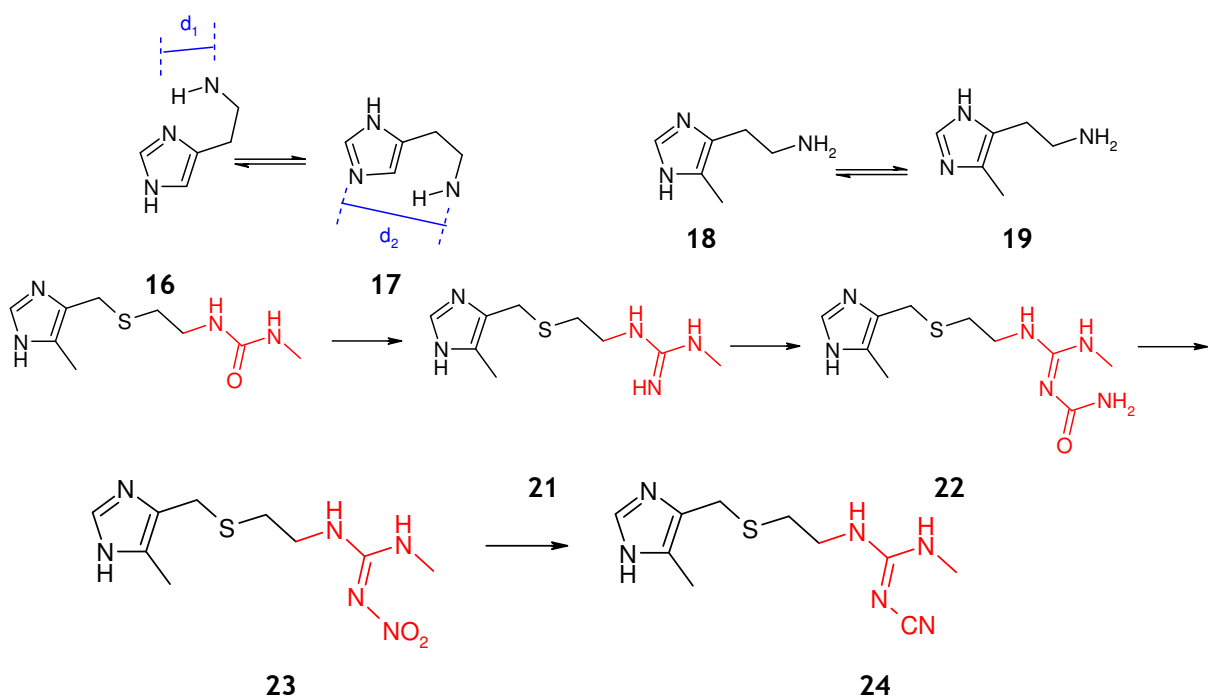
<sup>33</sup> Van de Waterbeemd, H.; Smith, D. A.; Jones, B. C.; *J. Computer-Aided Molec. Des.* 2001, 15, 273.

<sup>34</sup> Barreiro, E. J., Fraga, C. A. M., *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*. Porto Alegre 2001, Artmed Editora, pp. 85-86.

<sup>35</sup> Nogrady, T.; Weaver, D.F. *Medicinal Chemistry: A molecular and Biochemical Approach*. 3<sup>rd</sup>. edition. Nova Iorque 2005, Oxford University Press, pp. 267.



**Figura 8:** Robin Ganellin, Graham J. Durant, Michael E. Parsons e James W. Black no evento comemorativo promovido pela sociedade britânica e Americana de Química dos 25 anos da cimetidina<sup>36</sup>.



**Figura 9:** Tautômeros da histamina (**16** e **17**); tautômeros da metil-histamina (**18** e **19**); intermediários da cimetidina (**20** a **23**).

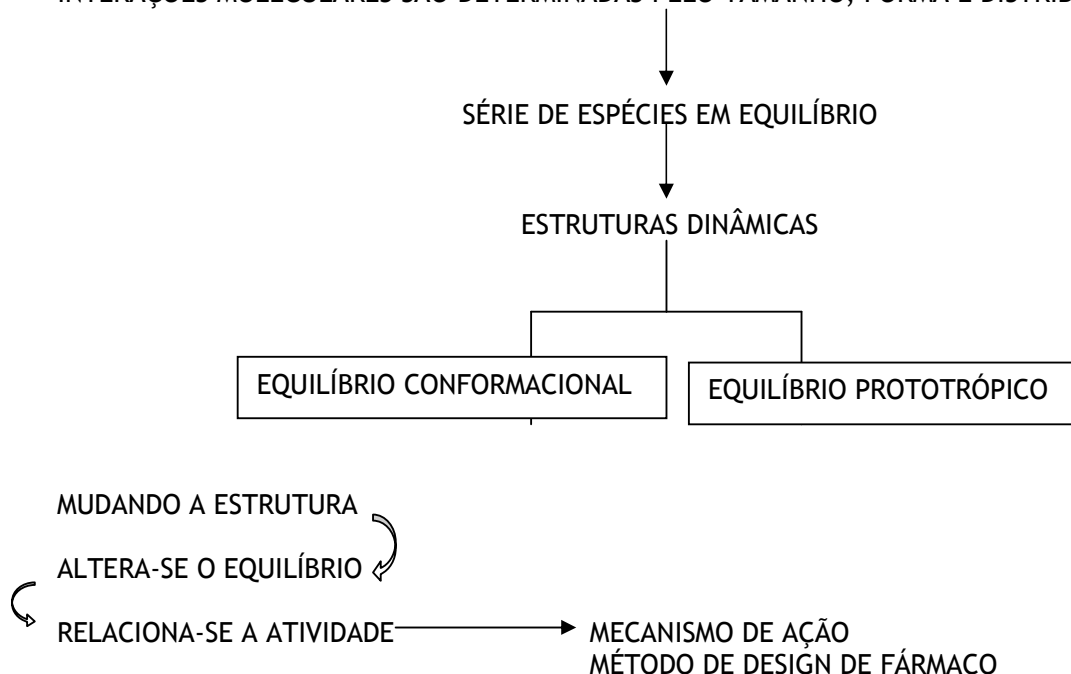
Segundo Ganellin<sup>37</sup>, as interações moleculares são determinadas fundamentalmente por tamanho da molécula, forma e distribuição de carga, mas quando se estuda moléculas nestes termos é preciso considerar as diferentes espécies em equilíbrio, ou seja sua natureza dinâmica tem que ser levada em conta. Entre os fatores que são necessário para estudo estão os equilíbrios conformacionais e prototrópicos o que leva ao esquema abaixo:

<sup>36</sup> [www.pomona.edu](http://www.pomona.edu), [www.biosolveit.de](http://www.biosolveit.de), <http://pubs.acs.org/cen/coverstory/83/8325/8325tagamet.html>

Acessado em: 07/06/2008

<sup>37</sup> Ganellin, R., *J. Med. Chem.*, 1981, 24(8), 913-920.

INTERAÇÕES MOLECULARES SÃO DETERMINADAS PELO TAMANHO, FORMA E DISTRIBUIÇÃO DE CARGA



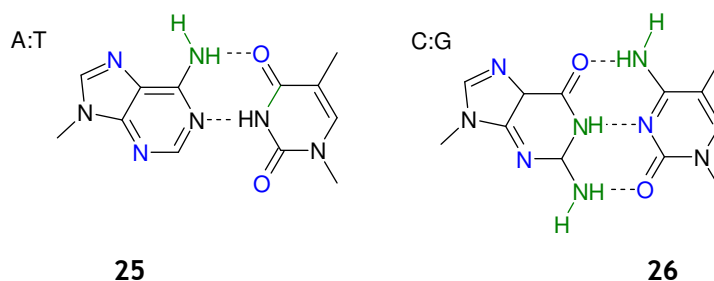
Este esquema sintetiza aquilo que Ganellin denominou Técnica de Análise da Dinâmica Estrutura-Atividade<sup>37</sup> (Dynamic Structure-Activity Analysis - DSAA), que segundo ele, explica a natureza da dinâmica das moléculas estudadas, esta foi a técnica utilizada para o planejamento da cimetidina.

Atualmente, para o planejamento racional de novos fármacos potenciais, dentro da área da Química Medicinal, é possível compreender indiretamente não só a maior (ou menor) biodisponibilidade, mas também as interações fármaco-receptor em nível molecular, graças ao desenvolvimento e esclarecimento das estruturas dos compostos envolvidos pelo uso das técnicas de cristalografia de raios-X e de modelagem molecular. Assim, possibilita-se efetuar a síntese ou a modificação molecular de substâncias bioativas de modo planejado e racionalizado através da descrição detalhada das moléculas, desde a sua constituição atômica (passando por relações entre a estrutura e propriedades físico-químicas) até suas características estruturais. Desta maneira, se leva em conta a(s) interação(ões) com os diferentes sistemas biofases/biológicos para a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos.

Dentre vários exemplos importantes e notórios no planejamento moderno de novos fármacos, com o uso de metodologias modernas de QSAR e de modelagem molecular, pode-se destacar o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos que interagem com o DNA<sup>38</sup>. Como já bem conhecido, o DNA apresenta na sua estrutura interna as bases nitrogenadas heteroaromáticas neutras, tornando a fenda hidrofóbica pela ocorrência de ligações de hidrogênio (Figura 10), mas, ao redor do DNA há os grupos fosfatos aniônicos, e sendo assim, dependendo-se

<sup>38</sup> Almeida, V. L.; Leitão, A., Donnici, C. L., Lopes, M. T. P., Montanari, C. A., *Quim. Nova*, 2005, 25, 118.

do ligante, o DNA terá diferentes tipos possíveis de interação. Tais interações podem ser atualmente visualizadas e investigadas através da distribuição do potencial eletrostático do DNA<sup>39</sup>, que é técnica de modelagem molecular usual (Figura 11), e dependendo da seqüência dos pares de bases é possível distinguir o potencial eletrostático, negativo e positivo, obtendo-se um mapa de contorno que direciona os estudos prévios com eficiência. Assim de modo geral na parte mais externa das fendas há os grupos fosfatos gerando maior densidade de carga negativa (mostrando cor avermelhada) e na parte mais interna tem-se maior densidade de carga positiva (mostrando cor esbranquiçada). Observam-se diferenças estruturais (forma e carga) em relação à diferente composição de pares A:T e G:C, que são também facilmente avaliadas pelos mapas de contorno do potencial eletrostático e assim os pares A:T exibem um potencial mais negativo e quando consecutivos geram fendas mais estreitas (3-4 Å). Por sua vez, os pares G:C exibem um potencial mais positivo (Figura 11) gerando fendas mais largas; por isso quase todos os ligantes da fenda menor ricos em A:T possuem cargas catiônicas, complementares ao potencial negativo da região A:T. Essa estrutura e esses fatores eletrônicos contribuem para seqüências específicas de ligação de ligantes à fenda menor<sup>40,41,42</sup>.



**Figura 10:** Visualização esquemática de ligações de hidrogênio, doadores (em azul) e receptores (em verde) nas extremidades das bases A:T e G:C segundo o modelo de Watson-Crick.

A existência desta forma convexa de DNA leva a interações seletivas com alguns fármacos bis-catiônicos, conhecidos como bis-amidinas, que são conformacionalmente côncavos, apresentando conformações ditas iso-hélicas, com a complementaridade adequada para a ocorrência de interações (“*isohelicity concept*”<sup>43</sup>). Incluem-se nessa classe de ligantes à fenda menor moléculas pequenas, que mostram seletividade por regiões A:T como por exemplo o berenil (**11**, Figura 7) (atividade antiprotozoária, tripanossomicida e antimicrobiana<sup>44</sup>) e o composto conhecido como Hoechst 33258 (**28**, Figura 12) (atividade antitumoral<sup>45</sup> e contra *Pneumocistii carinii*<sup>46</sup>). Há muitos estudos comparativos que mostram a interação com o DNA e atividades

<sup>39</sup> Neidle.S., *Nat .Prod .Rep.*, 2001, 18, 291

<sup>40</sup> Sauers, R. R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995, 5, 2573.

<sup>41</sup> Chang, D.; Cheng, S., *Int. J. Biol. Mol.*, 1996, 19, 279.

<sup>42</sup> Taberner, L.; Bella, J.; Alemán, C., *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24, 3458.

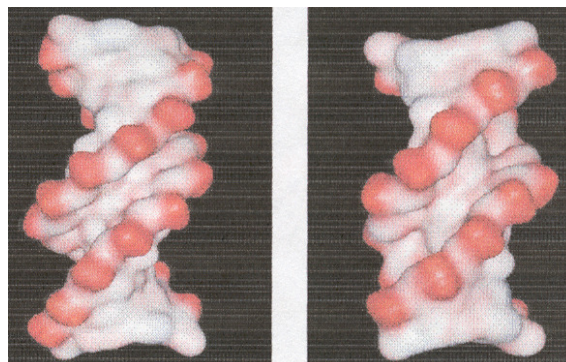
<sup>43</sup> Neidle.S., *Nat .Prod .Rep.*, 2001, 18, 291.

<sup>44</sup> Schmitz, H.; Hubner, W., *Biophys. Chem.*, 1993, 48, 61. Pilch, D. S.; Kirolos, M.A.; Liu, X.; Plum, G.E; Breslauer, K. J., *Biochemistry*, 1995, 34, 9962.

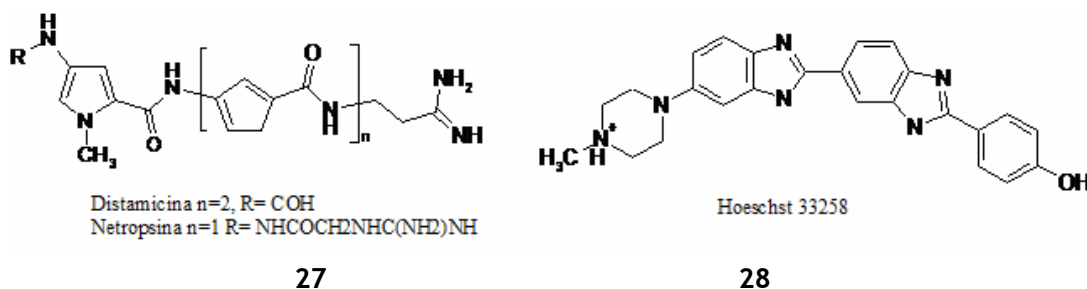
<sup>45</sup> Kraut, E. H.; Masspeis, L.; Bakerzark, S. Grever, M., *Proc. Amer. Soc. Clin. Oncol.*, 1988, 7, 62.

<sup>46</sup> Lombardy, R. L.; Taniou, F. A.; Ramachandran, K.; Tidewell, R. R and Wilson, W.D., *Med. Chem.*, 1996, 39, 1453.

biológicas de diversos outros compostos como distamicina e netropsina (27, Figura 13), sendo que todos estes se ligam mais firmemente as seqüências 5' - AAAA e 5' -AATT do que às seqüências 5' - TTAA e 5' -TATA, sendo que, dentre estes, o Hoechst 33258 mostrou maior habilidade para discriminar estas seqüências<sup>47</sup>.



**Figura 11:** Visualização do potencial eletrostático da superfície da dupla estrutura cristalina do oligonucleotídeo. (a) o dodecanucleotídeo d(CGCAAATTT-GCG) (NDB código BDL038), mostrando o estreitamento A:T na fenda menor, no centro da seqüência. (b) mostrando o alargamento G:C na fenda menor da estrutura cristalina d( CCAGGCCTGG ) (NDB código BDJ017).



**Figura 12:** Estruturas de distamicina, netropsina e Hoechst 33258.

Um dos primeiros compostos a ser identificado como real ligante à fenda menor (“*minor groove binders*”, MGBs) foi a netropsina (27, Figura 12), cuja energia de interação com o DNA é da ordem de  $10^{-12}$  Kcal mol<sup>-1</sup>, que mostrou elevada especificidade na interação com o DNA. A determinação experimental da estrutura cristalina da netropsina complexada com a dupla hélice do dodecanucleotídeo d(CGCGAATTCGCG)<sup>48</sup>, confirmou a interação entre esse fármaco e as bases A:T (Figura 13)<sup>49</sup>. O dodecanucleotídeo é amplamente adotado como um modelo geral para estudo de outras substâncias que se ligam à fenda menor<sup>50</sup>. Desta maneira, moléculas que apresentam

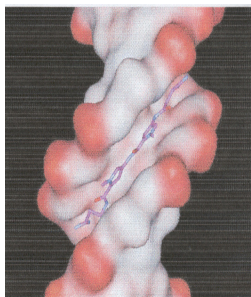
<sup>47</sup> A. Abudaya, P. M. Brown and K. R. Fox, *Nucleic Acids Res.*, 1995, 23, 3385. A. Abudaya and K. R. Fox, *Nucleic Acids Res.*, 1997, 25, 4962.

<sup>48</sup> M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Pjura; R. E. Dickerson, *J. Mol. Biol.*, 1985, 183, 553.

<sup>49</sup> Marky, L. A., Curry, J., Breslauer, K. J. *Molecular basis of Cancer*, Part B. Nova Iorque 1985, Alan R. Liss.

<sup>50</sup> H. M. Berman, W.K. Olson, D. L. Beveridge, J. Westbrook, A. Gelbin, T. Demeny, S-H Hsieh, A. R. Srinivasan and B. Schneider, *Biophys. J.*, 1992, 63, 751.

interações específicas com a fenda menor do DNA têm despertado interesse, como potenciais agentes terapêuticos em uma variedade de doenças humanas além de câncer<sup>6,51</sup>.



**Figura 13:** Visualização da estrutura cristalina da netropsina complexada com d(CGCGAATTCGCG) (NDB código GDLB05)

## ***1.2 NEOPLASIAS E COMPOSTOS QUE INTERAGEM COM DNA***<sup>52</sup>

Câncer, também conhecido como neoplasia, é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo se espalhar (metástase) para outras regiões do corpo. Esta é uma doença que atinge quase todos os organismos multicelulares. Em pesquisa realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a terceira causa de óbitos no mundo (12%), matando mais de 6,0 milhões de pessoas por ano. No Brasil é a segunda causa de mortes por doença, estimando-se em 2008, 466.730 casos novos; mais especificamente na região Sudeste, calcula-se que serão 120.330 novos diagnósticos<sup>53,19,54</sup>. Embora nenhum medicamento ou tratamento definitivo contra o câncer tenha sido encontrado, grande progresso na área da medicina conhecida como oncologia tem sido obtido na compreensão das causas do câncer, no desenvolvimento de tratamentos efetivos e de novos anticancerígenos<sup>55, 56</sup>.

A quimioterapia é o método (geralmente usado por via oral) que utiliza compostos químicos, chamados agentes quimioterápicos (ou antineoplásicos), no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos (patológicos). Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antitumoral. Os primeiros registros de tratamento quimioterápico efetivo surgiram no final do século passado com a descoberta da solução de Fowler (arsenito de potássio), por Lissaver (1885), e da toxina de Coley (combinação de produtos bacterianos), em 1890.

<sup>51</sup> Henderson, D., Hurley, L. H., *Nat. Med.*, 1995, 6525.

<sup>52</sup> Rajski, S. R., Williams, R. M., *Chem. Rev.*, 1998, 98, 2723.

<sup>53</sup> [http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=tbregioes\\_consolidado.asp&ID=1](http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=tbregioes_consolidado.asp&ID=1) (Acessado em 13/06/2008)

<sup>54</sup> Vasconcelos, A.C. Tópicos da Patologia; Instituto de Ciências Biológicas-Laboratório Apoptose. BeloHorizonte 1997, pp.31-34.

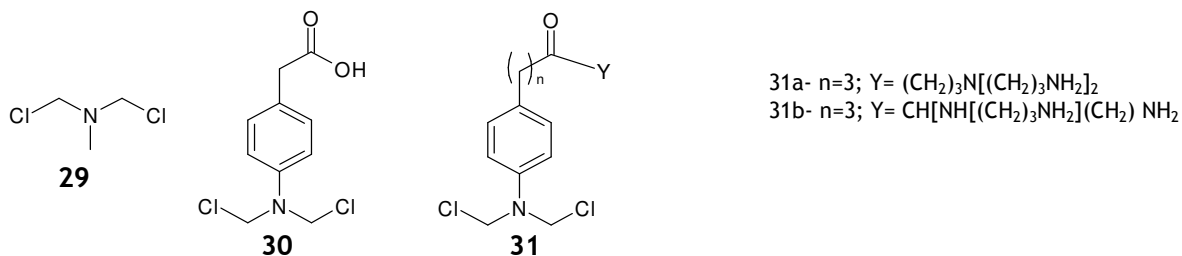
<sup>55</sup> Ministério da Saúde: Mensagem aos médicos. Câncer Fundamentos, Secretária de Assistência Médica-Divisão Nacional de Câncer. Brasília 1971, pp.7-47.

<sup>56</sup> <http://www.qmcweb.org> Acessado em 13/06/08

Diferentemente da cirurgia e da radioterapia, a quimioterapia é utilizada em tratamento sistêmico, ou seja, que atua em todo corpo, à base de fármacos que impedem a reprodução celular e, conseqüentemente, levam as células malignas à morte. Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia), sendo que a última apresenta resultados mais eficazes, pois consegue maior resposta a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência aos fármacos e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo<sup>58</sup>. Com isso, com a quimioterapia atual, pode-se obter maior expectativa de vida tendo-se em diversos casos até cerca de 66 % de pacientes livres do câncer por mais de 10 anos<sup>57</sup>.

A descoberta dos agentes alquilantes e dos seus efeitos terapêuticos, que têm seu mecanismo de ação relacionado com o DNA<sup>58, 59</sup> ocorreu de forma inusitada: em dezembro de 1943, um ataque aéreo alemão destruiu um depósito americano de gás mostarda (1,5-diclorotio-pentano, Cl(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Cl) em Bari, Itália, dando origem a mielo-depressão intensa entre o grupo de indivíduos contaminados, o que despertou a atenção de um grupo de farmacologistas clínicos a serviço do Pentágono<sup>57-61</sup>. Com a finalidade de produzir resultados terapêuticos, o fármaco foi então administrado num doente portador de linfoma maligno avançado e foi constatada uma regressão tumoral importante, porém de curta duração.

Dentre as várias classes destes fármacos antineoplásicos muito usados clinicamente, podem-se destacar alguns agentes antitumorais cuja ação está ligada a interações com o DNA<sup>128,52</sup>. A característica mais interessante destes agentes é que na maior parte dos casos trata-se de moléculas simples e que costumam apresentar mecanismo de ação definido. Entre estes agentes destacam-se os compostos nitrogenados, que são os mais antigos e mais estudados agentes antitumorais que interagem com o DNA<sup>52,60</sup> e que estão entre os compostos mais utilizados até hoje na clínica anticâncer<sup>61</sup>; destacando-se a mecloretamina (**29**, Figura 16) e o clorambucil (**30**, Figura 14).



**Figura 14:** Compostos nitrogenados que apresentam atividade antitumoral.

<sup>57</sup> Foye, W. O.; Sengupta, S. K. Principles of Medicinal Chemistry. Baltimore 1996, Williams & Wilkins, pp. 822-845.

<sup>58</sup> <http://quimioterapia.com.sapo.pt/quimioterapia.htm> Acessado em 13/06/08

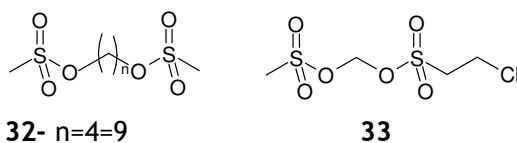
<sup>59</sup> <http://www.entreaqui.com.br/farmacologia/produtos/ver.asp?id=8> Acessado em 13/06/08

<sup>60</sup> Hopkins, P. B.; Millard, J. T.; Woo, J.; Weidner, M. F.; Kirchner, J. J.; Sigurdsson, S. T.; Raucher, S., *Tetrahedron*, 1991, 47, 2475. Kohn, K. W. In Topics in Structural & Molecular Biology: Molecular Aspects of Anti-cancer Drug Action. Weinheim 1994, Verlag Chemie; pp. 315. Lawley, P. D.; *BioEssays*, 1995, 17, 561. Gniazdowski, M.; Cera, C., *Chem. Rev.*, 1996, 96, 619. Paustenbach, D. J.; Finley, B. L.; Kacew, S., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1996, 211, 211.

<sup>61</sup> Gilman, A.; Phillips, F.S., *Science*, 1946, 103, 409.

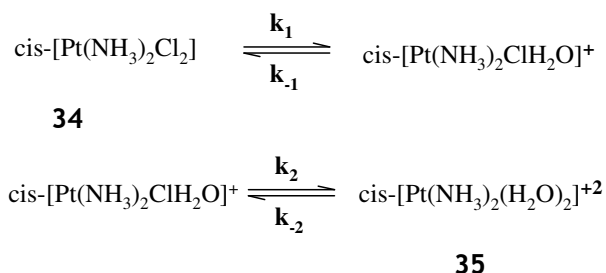


Outra classe de agentes antitumorais composta por moléculas simples e de alta atividade antitumoral para várias linhagens de células cancerosas é conhecida como classe dos alquil-sulfonatos<sup>57-59</sup>. Dentre eles destacam-se os análogos do busulfan (**32**, Figura 15)<sup>62</sup>, que mostra conclusiva atividade relacionada a interações cruzadas com o DNA e o clomesone (**33**, Figura 15), que apresenta alta atividade contra leucemia P388<sup>63</sup>.



**Figura 15:** Agentes antitumorais do grupo dos alquilsulfonatos

Há também o uso clínico do complexo conhecido como *cis*-platina, ou *cis*-Pt (**34**, Figura 16), descoberta há 150 anos atrás e que tem sido usada como eficiente agente antitumoral nos últimos 30 anos.<sup>64</sup> A ação da *cis*-platina tem sido enfatizada pela sua capacidade de formação de ligações<sup>65</sup> e de mutações<sup>66</sup> com o DNA. Outras evidências<sup>52</sup> sugerem que antes da sua ação biológica, a *cis*-platina passe por processos de hidratação e que a conversão da espécie neutra *cis*-Pt na espécie dicatiônica do complexo bis-aquoso (**35**) torna esta espécie especialmente atraída pelo DNA por interações eletrostáticas (Figura 16).



**Figura 16:** Equilíbrios químicos da hidratação da *cis*-Pt (**34**).

Uma outra recente classe de compostos (Figura 17) demonstra o possível efeito sinérgico da funcionalização mista de novos compostos planejados como antitumorais; a *cis*-platina foi complexada com bis-amina tipo espermidina (como em **36** e **37**), sub-unidade também ativa, e obteve-se aumento da atividade antitumoral; assim, os análogos diméricos da *cis*-platina com

<sup>62</sup> Tong, W. P.; Ludlum, D.B., *Biochem. Biophys. Acta*, 1980, 608, 174.

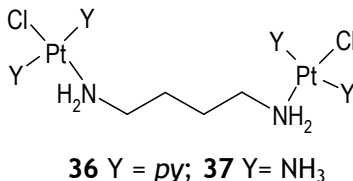
<sup>63</sup> Hartley, J. A.; Gibson, N.W.; Kohn, K. W.; Mattes, W. B. *Cancer Res.*, 1986, 46, 553 e 1943, 1986. Pegg, A. E.; Dolan, M. E.; Young, G. S. *Cancer Res.*, 1986, 46, 4500. Pegg, A. E.; Dolan, M. E.; Young, G. S. *Cancer Res.*, 1986, 48, 3603. Brent, T. P.; Lestrud, S. O.; Smith, D. G.; Remack, J. S. *Cancer Res.*, 1987, 47, 3384. Struck, R. F.; Alexander, J. A.; McCain, D. M.; Shealy, Y. F.; Rose, L. M., *Biochem. Pharmacol.*, 1991, 41, 457.

<sup>64</sup> Reedijk, J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1996, 801. Sherman, S. E.; Lippard, S. J., *Chem. Rev.*, 1987, 87, 1153. Lippard, S. J. Em: *Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy*. Nova Iorque 1991, Plenum Press, pp. 1-10.

<sup>65</sup> Corda, Y.; Job, C.; Anin, M. F.; Leng M.; Job, D., *Biochemistry*, 1993, 32, 8582. Brown, S. J.; Kellett, P.J.; Lippard, S. J., *Science*, 1993, 261, 603. Treiber, D. K.; Zhai, X. Q.; Jantzen, H. M.; Essigmann, J. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, 91, 5672. Pil, P. M.; Lippard, S. J., *Science*, 1992, 256, 234. Kutayavin, I. V. e col.; *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 9303.

<sup>66</sup> Brouwer, J.; Vandeputte, P.; Fichtingerschepman, A. M. J.; Reedijk, J.; *J. Proc. Nat. Acad. Sci. Biol. U.S.A.*, 1981, 78, 7010. Bublely, G. J.; Ashburner, B. P.; Teicher, B. A.; *Mol. Carinog.*, 1991, 4, 397. Cariello, N. F.; Swenberg, J.Á., Skopek, T. R., *Cancer Res.*, 1992, 52, 2866.

ligantes do tipo espermidina (Figura 17) não só têm mostrado muito ativos contra células tumorais<sup>67,68</sup> mas, principalmente ativos com tumores resistentes à *cis*-Pt<sup>69</sup>.



**Figura 17:** Complexos de platina com bis-aminas.

Apesar do objetivo primário da quimioterapia ser o de destruir as células neoplásicas, preservando as normais, a maioria dos agentes quimioterápicos, porém atua de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais,<sup>70,71</sup> particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, o que explica a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia: náuseas, perda de cabelo e suscetibilidade maior a infecções.<sup>72</sup> Assim, o uso clínico desses fármacos exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade na procura de um índice terapêutico favorável. Por este motivo pesquisadores do mundo todo procuram desenvolver novos agentes quimioterápicos mais seletivos e menos tóxicos, ditos antitumorais. Hoje, apesar de inúmeros agentes quimioterápicos usados para este tipo de ação, temos estimado que devem existir cerca de 350 novos compostos estudados e aplicados experimentalmente em mais de 20 mil pacientes em todo o mundo<sup>57,59,80</sup>.

### I.2.a.HÍBRIDOS: NOVOS COMPOSTOS-PROTÓTIPO ANTINEOPLÁSICOS

Uma abordagem recente e avançada para a descoberta de novos agentes antineoplásicos especialmente utilizáveis para o tratamento de novos casos de câncer (resistentes aos fármacos atuais) é o uso de compostos híbridos, ou o desenvolvimento de compostos-protótipos que sejam a combinação de dois ou mais produtos para formar um híbrido, uma nova espécie que talvez tenha a potência da atividade antineoplásica como a soma, ou o sinergismo das duas espécies separadas<sup>73</sup>. Há um exemplo da própria natureza: os alcalóides indólicos vimblastina (**38**, Figura 18) e vincristina (**39**, Figura 18) que são produtos naturais híbridos, como se fossem produtos da junção entre a catarantina (**40**) e a vindolina (**41**). A atividade anti-mitótica da catarantina (**41**) -

<sup>67</sup> van Boom, S. S. G. E.; Reedjik, J.; van Boom, J. H.; Farrell, N. Wang, A. H-J., *Nat. Struct. Biol.*, 1995, 2, 577b. Farrell, N.; Soares Fontes, A. P.; Appleton, T.G.; Roberts, J.D., *Biochemistry*, 1995, 34, 15480.

<sup>68</sup> Manzotti, C.; Pezzoni, G.; Giuliani, F.; Valsecchi, M.; Farrell, N.; Tognella, S., *Proc. AACR*, 1994, 35, 2628.

<sup>69</sup> van Houten, B.; Illeney, S.; Qu, Y.; Farrell, N., *Biochemistry*, 1993, 132, 11794

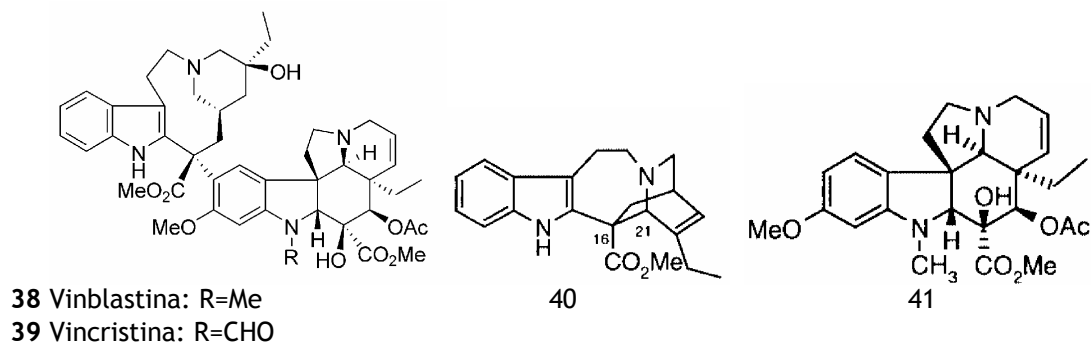
<sup>70</sup> Murad, A. M.; Katz, A. *Oncologia Bases Clínicas do Tratamento*. Rio de Janeiro, Guanabara, pp. 41.

<sup>71</sup> Salmon, S. E. Em: *Farmacologia Básica & Clínica*, Katzung, B. G. Rio de Janeiro 1998, Guanabara Koogan S. A., pp. 629-655.

<sup>72</sup> Spence, R. A. J.; Jonhston, P. G. Em: *Oncology*; Jonhston, P. G. Oxford 2001, Oxford University Press.

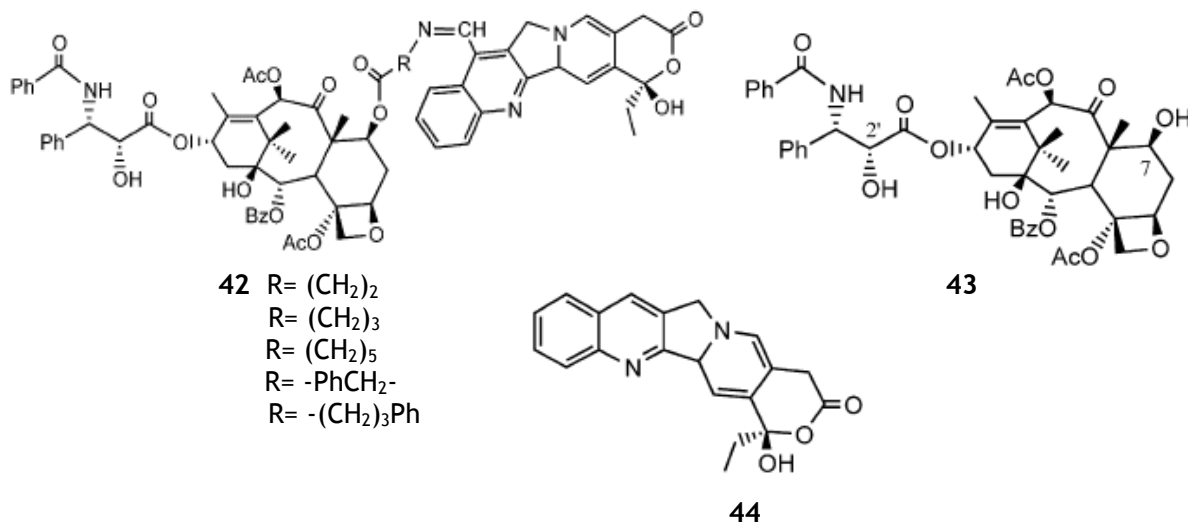
<sup>73</sup> Tietze, L. F.; Bell, P. H.; Chandrasekhar, S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 3996.

DL<sub>50</sub> *in vivo* (P-388): >800 mg/kg - é muito menor do que a atividade observada para a vinblastina (**38**) ou para a vincristina (**39**) - DL<sub>50</sub>: 17,2 e 5,3 mg/kg, respectivamente.<sup>74</sup>



**Figura 18:** Alcalóides indólicos vinblastina, vincristina, catarantina e vindolina.

Um outro exemplo (Figura 19) que demonstra a grande potencialidade da abordagem de modificação molecular a partir da formação de híbridos (tipo **42**), é entre o taxol (**43**, Paclitaxel<sup>®</sup>) - fármaco anti-neoplásico dos mais utilizados no mundo - e a camptotecina (**44**) um potente inibidor da topoisomerase muito usado para o tratamento de câncer de estômago, do cólon e do reto<sup>57</sup> (Figura 19). Todas as novas espécies químicas híbridas tipo **42** formadas são agentes antineoplásicos mais potentes do que as espécies **43** e **44** separadas ou do que a mistura destas.



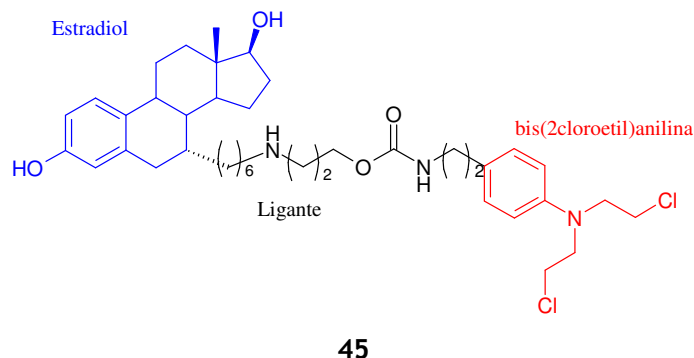
**Figura 19:** Estruturas do híbrido (**42**) formado por taxol (**43**) e camptotecina (**44**).

Croy e colaboradores prepararam com sucesso um composto híbrido (**45**, Figura 20) contendo estradiol e N,N-bis(2-cloroetil)anilina, com o objetivo de obter compostos que fossem

<sup>74</sup> Prakash, V.; Timasheff, S. N., *Biochemistry*, 1991, 30, 873.

seletivos para células de câncer de mama devido a interação covalente com o DNA que o fragmento de N,N-bis(2-cloroetil)anilina apresenta.<sup>75</sup>

Da mesma forma, vários pesquisadores vêm estudando novos derivados bis-funcionalizados mistos/híbridos sendo digno de nota, que estes agentes foram compostos-modelo para o planejamento racional de novos análogos com potencial atividade antineoplásica. Dentre os vários estudos relatados, selecionaram-se os estudos de Cohen e colaboradores<sup>76</sup>, de Stark e Meadows<sup>77</sup> sobre derivados mistos tipo espermidina-clorambucil (46 e 47, Figura 21) e de Prakash e colaboradores<sup>78</sup> que estudaram derivados mistos tipo intercalantes-clorambucil (48 a 50, Figura 21), todos com alta potencialidade como agentes antineoplásicos. Pode-se notar que nestes casos deve ocorrer o efeito sinérgico da parte tipo alquilante (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>Cl) com a outra parte adicionada: no primeiro caso, os grupos amino da parte espermidínica devem estar protonados e gerar interações eletrostáticas com o DNA; no segundo caso, há os anéis heteroaromáticos que devem adentrar na fenda do DNA por intercalação gerando interações lipofílicas secundárias, mas importantes.



**Figura 20:** Composto híbrido 45 que apresenta seletividade para células de câncer de mama.

Há exemplos de compostos funcionalizados híbridos entre mostardas nitrogenadas e com presença e com a presença de grupos tioureido que também apresentam atividade antitumoral. Em 1995, Chen, Wang e Zhou<sup>79</sup> relataram a baixa toxidez e a alta potência antitumoral, além de atividade viruscida de derivados tipo clorambucil U, mas polifuncionalizados com grupo N-tioureido e fosforoimidato (Figura 22).

<sup>75</sup> Sharma, U.; Marquis, J.C; Dinaut, A.N.; Hillier, S.M.; Fedeles, B.; Rye, P.T; Essigmann, J.M.; Croy, R.G., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14, 3829–3833.

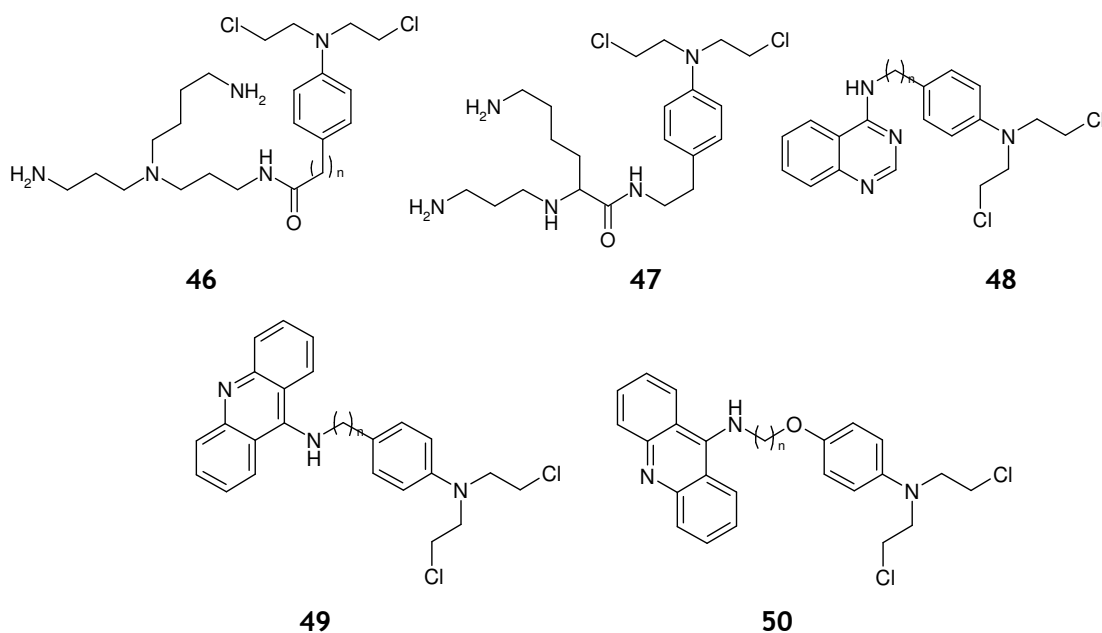
<sup>76</sup> Cohen, G. M.; Cullis, P. M.; Hartley, J. A.; Mather, A.; Symons, M. C. R.; Wheelhouse, R. T., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1992, 298. Holley, J. P.; Mather, A.; Wheelhouse, R. T.; Cullis, P. M.; Hartley, J. A.; Bingham, J. P.; Cohen, G. M., *Cancer Res.*, 1992, 52, 4190. Pegg, A. E.; McCann, P. P., *Am. J. Physiol.*, 1982, 243, C212. Seiler, N.; Dezeuere, F., *Int. J. Biochem.*, 1990, 211. Janne, J.; Poso, H.; Raina, A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 473, 241. Bergeron, R. J.; McManis, J. S.; Liu, C. Z.; Feng, Y.; Weimar, W. R.; Luchetta, G. R.; Wu, Q.; Ortiz-Ocasio, J.; Vinson, J. R. T.; Kramer, D.; Porter, C., *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 3464.

<sup>77</sup> Stark, P. A.; Thrall, B. D.; Meadows, G. G.; Abdel-Monem, M. M., *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 4264.

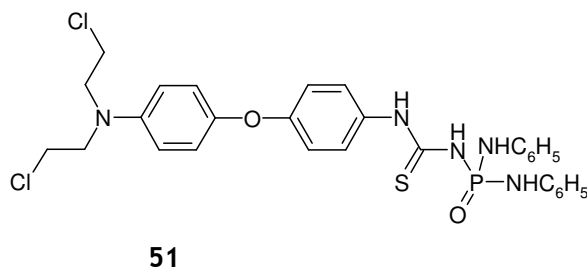
<sup>78</sup> Prakash, A. S.; Denny, W. A.; Gourdie, T. A.; Value, K. K.; Woodgate, P. D.; Wakelin, L. P. G., *Biochemistry*, 1990, 29, 9799.

<sup>79</sup> Chen, R. Y.; Wang, H. L.; Zhou, J., *Chem. J. Chin. Univ.*, 1995, 16, 1229.

Além disso, o grupo tioureido (ou S-tioureido,  $S(C=NH)NH_2$ ) tem sido mostrado como grupo farmacológico em alguns estudos, entre os quais, o de El-Subbagh e Obaid<sup>80</sup>, em 1996, reportaram que tiazóis tioureido-substituídos (**52**, Figura 23) apresentam atividade antitumoral contra aproximadamente 60 linhagens de células tumorais, tais como: leucemia, pulmão, próstata, ovário e mama entre outros. Os autores concluíram que o grupo  $NHCSNH-R$  (ou  $R'$ ) em questão era essencial para atividade antitumoral dos compostos estudados.

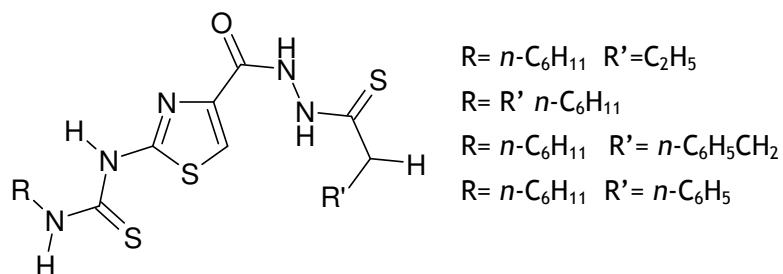


**Figura 21:** Estruturas nitrogenadas mistas tipo espermidina-clorambucil **48** e **49**; tipo intercalante-clorambucil **50** e **52**.



**Figura 22:** Estrutura de misto polifuncionalizado tipo clorambucil U.

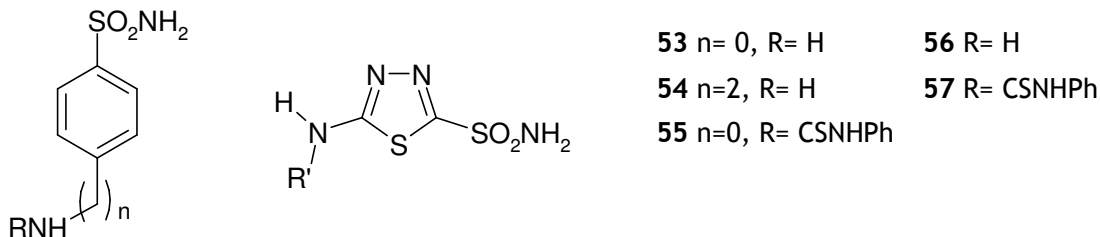
<sup>80</sup> Subbagh, H. I.; Obaid, A. M., *J. Med. Chem.*, 1996, 31, 1017.



52

**Figura 23:** Alguns dos tiazóis 2,4-dissubstituídos estudados por El-Subbagh e Obaid.

Em 1998, Supuran e colaboradores<sup>81</sup>, baseados em cálculos de QSAR, descreveram o estudo da inibição da anidrase carbônica (CA) por derivados heterocíclicos sulfonamídicos tioureído substituídos (Figura 24). As sulfonamidas por eles estudadas apresentavam os substituintes ureído ou tioureído ( $\text{H}_2\text{N-CX-NH-}$ ;  $X = \text{O}, \text{S}$ ) ligados ao anel aromático e apresentaram potencial inibitório contra as iso-enzimas hCA I, hCA II, e hCA IV (h= humano). Foi também observado que estas NCE podem ser usadas no tratamento do glaucoma e também podem atuar como agentes antibacterianos.



**Figura 24:** Alguns dos heterocíclicos sulfonamídicos tioureído-substituídos estudados por Supuran e colaboradores<sup>90</sup>.

Como o grupo tioureído pode ser protonado, especialmente em pH fisiológico, este grupo torna-se um possível bioisótero do grupo bisamidina, ou seja, o grupo tioureído pode ser investigado como grupo funcional protótipo para investigação de novos agentes anti-neoplásicos e/ou anti-microbianos e que a princípio podem ter o seu mecanismo de ação relacionado à interação com o DNA.

### I.3-DOENÇAS INFECCIOSAS EMERGENTES - MICRORGANISMOS - FUNGOS E BACTÉRIAS

As infecções causadas por fungos<sup>82</sup>, quando limitadas à superfície dos tecidos, são relativamente fáceis de serem curadas. Contudo, em pacientes cujo sistema imunológico está comprometido, no caso de pacientes em tratamento de quimioterapia ou transplantados por

<sup>81</sup> Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Jurca, B. C.; Ilies, M. A., *Eur.J. Med. Chem.*, 1998, 33, 83.

<sup>82</sup> Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. – *Microbiologia*, 6ª ed., Porto Alegre 2000. Simmons, R.D.G. *Medical Mycology*. Amsterdam 1954, Lacaz, C. S. Porto, E.; Martins, J. E. C.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T. *Tratado de Micologia Médica* Lacaz, São Paulo 2001. SUGITA, T., *Farumashia*, 2008, 44(1), 27-31.

exemplo, as infecções causadas por fungos podem ser graves<sup>83</sup>. Nos últimos anos tem ocorrido o aumento do número de pacientes em internação hospitalar prolongada e de pacientes imunologicamente vulneráveis (principalmente entre os muito jovens, os muito idosos, indivíduos transplantados e portadores de doenças imunossupressoras) e também tem aumentado a frequência de infecções por patógenos oportunistas tanto a fungos como a bactérias. Tais internações propiciam uma maior exposição do paciente a patógenos multirresistentes, comumente presentes nos centros hospitalares e, além do mais, há o agravamento da resistência bacteriana pela limitação das opções terapêuticas para as infecções envolvendo estes microrganismos<sup>84</sup>. Todavia, o que tem assustado a comunidade leiga e, principalmente a comunidade científica é que, ao longo dos últimos dez anos, a incidência de infecções importantes causadas por fungos tem aumentado muito em número e em gravidade. Não se restringindo ao tipo de pacientes portadores de HIV, neoplasias ou transplantes, mas também a pacientes com doenças respiratórias como asma, pneumonia e até com artrite reumatóide<sup>85</sup>. Além disso, o uso irracional de antibióticos de amplo espectro de ação tem levado ao surgimento de populações de fungos resistentes a estes agentes antifúngicos<sup>86</sup>, apesar da maior parte dos fungos patogênicos ser muito bem conhecida tanto quanto o seu tratamento clínico. Este problema tem sido tão sério e crescente mundialmente que os epidemiologistas no mundo inteiro vêm alertando os órgãos governamentais de saúde pública com o uso dos termos específicos: doenças infecciosas emergentes (DIEs) ou infecções fúngicas invasivas (IFIs)<sup>93-108</sup>. Alguns cientistas especialistas na área de Microbiologia e de saúde vêm indicando a necessidade de uma guerra contra estes microrganismos resistentes, visando à necessidade urgente do desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes contra estes fungos de alta patogenicidade<sup>84</sup>. O tratamento destas infecções fúngicas invasivas (IFIs) e oportunistas permanece ainda insatisfatório com o uso da maior parte dos agentes antifúngicos usuais, tais como o voriconazol no qual um estudo relatou que em 47 a 68% dos pacientes não houve eficácia terapêutica. Separando os agentes patogênicos, os valores de ineficiência terapêutica para o uso de voriconazol são os seguintes: 43,7% para aspergilose, 57,5% para candidíase, 38,9% para criptococose, 45,5% para fusariose e 30% para escedosporiose<sup>87,88</sup>. Tal quadro epidemiológico levou os EUA a estabelecer protocolos nacionais de diagnose e tratamento com o Comitê Nacional de Padronizações para Clínica Laboratorial - *NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)*<sup>89,90</sup>.

---

<sup>83</sup> Anaissie, E., *Clin. Infect. Dis.*, 1992, 14, S43. Hadley, S.; Karchmer, A. W., *Infect. Dis. Clin. N. Am.*, 1995, 9, 1045.

<sup>84</sup> Harbarth, S.; Samore, M. H., *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, 11, 794. McGowan, J. E. JR.; Tenover, F. C., *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, 2, 251.

<sup>85</sup> Garcia-Ruiz, J-C.; Amutio, E.; Ponton, J.; *Revista Iberoamericana de Micología : organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micología*, 2004, 21(2), 55-62.

<sup>86</sup> Sundriyal, S.; Sharma, R.K.; Jain, R., *Curr. Med. Chem.*, 2006, 13, 1321.

<sup>87</sup> Perfect, John R.; Marr, Kieren A.; Walsh, Thomas J.; Greenberg, Richard N.; DuPont, Bertrand; de la Torre-Cisneros, Julian; Just-Nubling, Gudrun; Schlam, Haran T.; Lutsar, Irja; Espinel-Ingroff, Ana; Johnson, Elizabeth., *Clin. Infect. Dis.*, 2003, 36(9), 1122-1131.

<sup>88</sup> Espinel-Ingroff, A., *J. Clin. Microbiol.*, 2001, 39(3), 954-958.

<sup>89</sup> Moellering, Robert C., Jr.; Graybill, John R.; McGowan, John E., Jr.; Corey, Lawrence., *Am. J. Med.*, 2007, 120(7), S4-S25.

<sup>90</sup> Carrillo-Munoz, A. J.; Quindos, G.; Lopez-Ribot, J. L., *Curr. Med. Chem.*, 2004, 3(4), 297-323.

Diante deste grave e crescente problema de saúde mundial, o governo americano estabeleceu uma comissão nacional para a estudo e prevenção das doenças microbianas resistentes - *Antimicrobial Resistance Prevention Initiative (ARPI)* - cuja meta principal é auxiliar no desenvolvimento de novos agentes anti-microbianos mais eficientes<sup>89,91</sup>. Assim, a pesquisa por novos agentes anti-microbianos e/ou a modificação molecular de compostos químicos já existentes para descoberta de novos compostos-protótipo ou *NCE* com potencial atividade antifúngica são importantes ferramentas para garantir-se o combate ao crescente número de fungos patogênicos resistentes e proporcionar o uso clínico de compostos cada vez mais eficientes e menos tóxicos.

É digno de nota que acredita-se que mudanças climáticas e ambientais sejam as responsáveis por um aumento de 10 vezes nos casos de infecções por *Coccidioides immitis* na Califórnia. Atualmente, estão sendo investigadas novas técnicas para diagnóstico e tratamento de infecções fúngicas<sup>92</sup>. Para solucionar esta crise, serão necessárias algumas medidas, entre elas, a intensificação das campanhas educacionais para promover o uso correto dos antibióticos existentes e, como já citado, o incremento dos esforços para o desenvolvimento de novos antibióticos.

No caso do Brasil a problemática também já foi constatada há tempos e já existem iniciativas para o estudo das implicações sociais, científicas e tecnológicas para o tratamento de doenças infecciosas emergentes (DIEs)<sup>93</sup>.

### **I.3.a-Algumas das Principais Infecções Causadas por Fungos**

Dentre as diversas doenças causadas por fungos, selecionaram-se as principais delas relacionadas a este trabalho.

#### **I.3.a.1-Aspergilose:**

A aspergilose é grave problema de saúde pública e de contaminação ambiental de plantações de milho e de arroz, contudo neste texto tratar-se-à especificamente do problema de saúde pública. A aspergilose é uma doença pulmonar, ou uma micose, causada predominantemente pelo fungo *Aspergillus fumigatus* que é geralmente benigna, mas assumindo

---

<sup>91</sup> Pfaller, M. A.; Diekema, D. J., *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42(10), 4419-4431. Walsh, Thomas J.; Petraitis, Vidmantas; Petraitiene, Ruta; Field-Ridley, Aida; Sutton, Deanna; Ghannoum, Mahmoud; Sein, Tin; Schaufele, Robert; Peter, Joanne; Bacher, John; Casler, Heather; Armstrong, Derek; Espinel-Ingroff, Anna; Rinaldi, Michael G.; Lyman, Caron A., *J. Infec. Dis.*, 2003, 188(2), 305-319. Gurgui, M.; Munoz, P., *Enf. Infec. Microbiol. Clin.*, 2007, 25(9), 587-97. Amália, del Palacio; Almudena, Alhambra; Soledad, Cuetara Maria; Ponton J.; *Revista Iberoamericana de Micología : organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micología*, 2007, 24(3), 187-197.

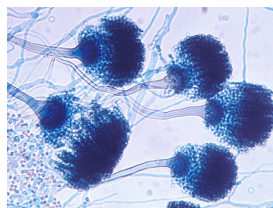
<sup>92</sup> Drouhet, E. Historical introduction: Evolution of Knowledge of the fungi and mycoses from Hippocrates to the twenty-first century. Em: Ajello, L.; Hay, R. *Medical Mycology*. Vol. 4. Londres, 1998.

<sup>93</sup> Marques, M. B. *Emerging Infectious Diseases in the Realm of Complexity: Implications for Scientific and Technological Policies. Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, II (3): 361-388,1995. , 1995.



particular importância clínica em infecções sistêmicas malignas em doentes com o sistema imunológico suprimido. Os micélios crescem no hospedeiro em forma de bolas, denominadas aspergilomas (Figura 25). As infecções oculares, devido às feridas não tratadas levam quase sempre à perda desse órgão de visão, porém a doença é geralmente controlada exceto, como já citado, nos imunossuprimidos. Nestes casos pode inclusive ocorrer aspergilose cerebral, cardíaca ou da medula óssea resultam quase sempre em morte, se não tratadas a tempo, devido a hemorragias e enfartes múltiplos nos órgãos. Usualmente ocorre a micotoxicose que é devida à ingestão de comida contaminada, cujos sintomas envolvem vômitos, diarreia e náuseas. O *Aspergillus* pode ainda causar reações alérgicas sem se multiplicar ou infectar a pessoa, como na asma e rinite alérgica. A constante exposição ao fungo pode causar reações agressivas do sistema imunológico na ausência da sua multiplicação, por vezes resultando em problemas pulmonares após muitos anos. Contudo, os casos mais graves são devidos à formação de microrganismos resistentes, pois estes começam a produzir micotoxinas de alta toxidez nos animais e em humanos<sup>94</sup>. Além disso, a aspergilose é considerada a maior responsável pela mortalidade de pacientes transplantados<sup>95</sup>, sendo que a aspergilose pulmonar é uma complicação grave em pacientes que realizaram transplante de pulmão e *Aspergillus fumigatus* é a espécie mais comumente isolada destes pacientes<sup>96</sup>.

O *A. fumigatus* apresenta resistência a antifúngicos do tipo azólico (como o itraconazol)<sup>97</sup> e mesmo a antifúngicos poliênicos e equinocandínicos<sup>98</sup> o que denota a inexistência do conhecimento dos mecanismos de resistência destes microrganismos e ressalta a urgência no desenvolvimento de novos agentes anti-microbianos mais eficientes para tratamentos mais eficazes.<sup>99</sup>



**Figura 25:** Os micélios de *A. fumigatus* denominados aspergilomas<sup>100</sup>.

### I.3.a.2-Candidiase

O gênero *Candida* é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas em ambiente hospitalar e constitui causa relevante de infecções de corrente sanguínea, sendo o fungo mais

<sup>94</sup> Varga, J., *Fungi*, 2007, 112-127.

<sup>95</sup> Pannuti, C.; Gingrich, R.; Pfaller, M. A.; Kao, C.; Wenzel, R. P., *Câncer*, 1992, 69, 2653.

<sup>96</sup> Kanj, S. S.; Welty-Wolf, K.; Madden, J.; Tapson, V.; Baz, M. A.; Davis, R. D.; Perfect, J. R., *Medicine*, 1996, 75, 142; Walsh, T. J.; Pizzo, P. A. *Annu. Rev. Microbiol.* 1988, 42, 517.

<sup>97</sup> Mellado, E.; Alcazar-Fuoli, L.; Garcia-Effron, G.; Alastruey-Izquierdo, A.; Cuencia-Estrella, M.; Rodriguez-Tudela, J. L., *Med./Mycology*, 2006, 44(1), S367-S371.

<sup>98</sup> Chamilos, G.; Kontoyiannis, D. P., *Drug Resistance Updates*, 2005, 8(6), 344-358.

<sup>99</sup> Maertens, Johan; Theunissen, Koen; Boogaerts, Marc., *Current Medicinal Chemistry: Anti-Infective Agents*, 2002, 1(1), 65-81.

<sup>100</sup> <http://mais-saude.blogspot.com/2007/11/aspergillus-fumigatus-um-fungo.html> (acessado em 13/06/2008).

comumente associado à candidíases<sup>101</sup>. As infecções por *Candida* são frequentemente causadas por *Candida albicans* (Figura 26) e podem ocorrer como candidíase vulvovaginal (mais comum) ou infecções em mucosas, etc. Estima-se que os custos na área da saúde nos EUA para este tipo de patologia aumentam anualmente em mais de um bilhão de dólares. Esta enfermidade atinge principalmente pacientes transplantados, portadores de imunodeficiência, diabéticos, queimados, etc<sup>103</sup>.

Entre os diversos fungos patogênicos o gênero *Candida* é um dos mais conhecidos e é o alvo direto de nosso trabalho. Cabe ressaltar um importante artigo de revisão<sup>102</sup> que relata o grave quadro epidemiológico da candidíase invasiva e resistente, com grande aumento do índice de mortalidade - relacionada principalmente a infecções causadas por *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* - que aumentaram nos EUA, de 1.557 mortes em 1980 para 6.534 mortes em 1997. Existem mais de 17 espécies de *Candida* conhecidas como agentes patogênicos em humanos, mas cerca de 90% das infecções relatadas se devem a cinco delas (Tabela 2)<sup>102</sup>.

**Tabela 2:** Percentagens de incidência de casos de *Candida spp.* relatadas em 127 instituições de 39 países do mundo entre 1997 e 2003, para as cinco espécies que mais causam infecções.

Espécies	% do Total de Número de Casos Relatados					
	1997-1998	1999	2000	2001	2002	2003
<i>C.albicans</i>	73,3	69,8	68,1	65,4	61,4	62,3
<i>C.glabrata</i>	11,0	9,7	9,5	11,1	10,7	12,0
<i>C.tropicalis</i>	4,6	5,3	7,2	7,5	7,4	7,5
<i>C.parapslosis</i>	4,2	4,9	5,6	6,9	6,6	7,3
<i>C.krusei</i>	1,7	2,2	3,2	2,5	2,6	2,7

A candidíase pode ser manifestada clinicamente por: candidoses nas mucosas (oral, vaginal ou esofagial), endocardites, meningites, peritonites, candidose hepatosplênica, candidose mucocutânea crônica<sup>103</sup>.



**Figura 26:** Colônia de *C. albicans*, a principal espécie patogênica do gênero *Candida spp.*

### I.3.a.3-Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é infecção granulomatosa sistêmica, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Figura 27)<sup>104</sup> comum na América Latina, particularmente no Brasil

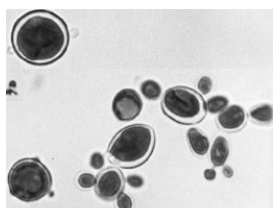
<sup>101</sup> Colombo, A.L.; Guimarães, T., *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2003, 36, 599.

<sup>102</sup> Pfaller, M. A., Diekema, D. J., *Clin. Microbiol. Rev.*, 2007, 20(1), 133-163. (e referências relatadas)

<sup>103</sup> Maertens, J., Vrebos, M., Boogaerts, M., *Eur. J. Cancer Care*, 2001, 10, 56-62.

(responsável por 80% dos casos reportados mundialmente). Após inalação dos esporos, as leveduras localizam-se nos pulmões, sendo fagocitadas pelos macrófagos, no interior dos quais sobrevivem e se multiplicam. Podem ocorrer sintomas de pneumonia, com febre, suores, tosse e expectoração e falta de ar e se houver disseminação do fungo, mesmo na ausência de sintomas pulmonares, com infecção de órgãos e formação de granulomas o que acarretará a formação de úlceras vermelhas na pele e mucosas, particularmente na boca e nariz, que serão talvez os sintomas mais comuns da doença<sup>105</sup>.

A crescente resistência deste microrganismo e a sua patogenicidade têm sido constatadas sendo que, em cerca de 10% dos casos, há acometimento do sistema nervoso central (SNC)<sup>106</sup> conduzindo a graves quadros clínicos que geralmente não são curáveis com os antifúngicos usuais e que já foram detectados em Belo Horizonte<sup>107</sup>. Este tipo de manifestação da doença provoca uma taxa de mortalidade de 53% nos casos relatados<sup>108</sup>.



**Figura 27:** Aparência microscópica da colônia de *P. brasiliensis* em cultura de agar.

#### I.3.a.4- Esporotricose

Esta doença é causada por fungo dimórfico, *Sporothix schenckii* (Figura 28)<sup>109</sup> que acomete o homem e os animais, sendo assim classificada como uma dermatozoonose. É cosmopolita, podendo ser encontrada no mundo todo, mas há regiões onde a incidência de casos tem crescido muito nos últimos anos, uma destas regiões, no Brasil localiza-se no estado do Rio de Janeiro. Além do acometimento de cães, gatos e seres humanos há relatos em eqüinos, primatas, asininos, bubalinos e murinos<sup>110</sup>. O quadro epidemiológico piora muito com a disseminação de fungos resistentes em pacientes imunossuprimidos.<sup>111</sup>

<sup>104</sup> [http://www.reviberoammicol.com/photo\\_gallery/Paracoccidioides/brasiliensis/](http://www.reviberoammicol.com/photo_gallery/Paracoccidioides/brasiliensis/) (acessado em 13/06/2008)

<sup>105</sup> Calich, V. L. G.; Blotta, M.; Souza Lima; H.; Fungal Immunol. 2005, 201-227. Yasuda, M. A. S., *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2005, 6(3), 385-397.

<sup>106</sup> Palmeiro, M., Cherubini, K.; Yurgel, L. S., *Paracoccidioidomycosis – Literature Review*. Scientia Medica, 15(4), 2005.

<sup>107</sup> Walter J. Fagundes-Pereyra, *Arq. Neuropsiquiat.*, 2006, 64(2-A), 269-276.

<sup>108</sup> Plá M.D.P., Hartung C., Mendoza P., Stukanoff A., Moreno, M.J., *Mycopathologia*, 1994, 127, 139-144. Nóbrega, J.P.S., Mattosinho-França, L.C., Spina-França, A. *Neuroparacoccidioidomycose*. Em: Del Negro, G., Lacaz C.S., Fiorilho A.M. (eds). *Paracoccidioidomycose*. São Paulo 1982, Savier - Ed. da Universidade de São Paulo, pp.221-227.

<sup>109</sup> <http://www.microbelibrary.org/Fungi/details.asp?id=380&Lang=Brazilian%20Portuguese> (Acessado em: 13/06/2008).

<sup>110</sup> Scott, D.W.; Miller Jr. W.H.; Griffin, C.E.; *Immune-Mediated Disorders, Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*, 6 o ed. Philadelphia, Saunders, p.386-390, 2001 Greene, C. E.; *Sporotrichosis, Infection Diseases of dog and cats*, 3º ed. Philadelphia, Sauders, p. 608-612, 2006.

<sup>111</sup> Stephensonb, D.R. Jenkinsa, Wiselkab, M.J., Hardmana,S., Johnson, E.M., *J. Infect.*, 2005, 51, e73–e77.



Figura 28: Colônia de *S. schenkii*.

### I.3.a.5- Criptococose:

*Cryptococcus neoformans* é um fungo encapsulado (Figura 31) responsável por cerca de 5-10% das infecções causadas em pacientes com AIDS. A meningite é a manifestação mais comum da criptococose<sup>112</sup> principalmente em indivíduos imunodeprimidos (AIDS, neoplasias, diabetes, transplantados, etc.). Estudos têm comprovado a capacidade deste fungo de colonizar o trato intestinal de aves como pombos e papagaios,<sup>113,114</sup> tendo assim relação com as infecções causadas por fezes destes animais. Devido à adaptação dos pombos em centros urbanos, a presença deste fungo em suas fezes e a consequente contaminação da poeira domiciliar<sup>115</sup>, a preocupação é crescente, pois o contágio pode se dar por inalação ocorrendo, num primeiro estágio a criptococose nos pulmões. Além disso, há outras formas de manifestação de contaminação por esta levedura, tais como: pneumonia, lesões na pele e osteomielites<sup>103</sup>.



Figura 29: Esporos de *C. neoformans*.

### I.3.b. Agentes Quimioterápicos Antimicrobianos - Antibióticos<sup>116</sup>

Os agentes quimioterápicos preparados de reagentes químicos em laboratórios, são denominados *fármacos sintéticos*; as substâncias químicas produzidas naturalmente por bactérias ou fungos, para atuar contra outros microrganismos, são chamados de *antibióticos*. O primeiro antibiótico foi descoberto ao acaso por Alexander Fleming, um médico e bacteriologista escocês, que quase estava descartando algumas culturas em placas que haviam sido contaminadas por

<sup>112</sup> Bryan, R. A.; Huang, X.; Morgenstern, A.; Bruchertseifer, F.; Casadevall, A.; Dadachova, E., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, 52(6), 2232-2235. Franzot SP, Hamdan JS, Curie BP, Casadevall A., *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 35, 2243-51.

<sup>113</sup> Filiú, W. F. O., Wanke B., Agüena S. M., Vilela V. O., Macedo R. C. L., Lazera M., *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2002, 35(6), 591-595.

<sup>114</sup> Assato, A. T., Fortes, M. S., Lazera, S., Manke, M., Meningoencefalite por *Cryptococcus neoformans* var *gatti*- em Indígena HIV Negativo -relato de caso Fortes, 6º Congresso de neurocirurgia, 1999. (<http://neuroc99.sld.cu/text/meningoencefalite.htm> acessado em 13/06/08.)

<sup>115</sup> Passoni L.F.C. *Revista Iberoamericana de Micologia : organo de la Asociacion Espanola de Especialistas en Micologia*, 1999, 16, 77-81. Passoni, L. F. C., Wanke, B., Nishikawa, M. M., Lazera, M. S., *Med. Mycol.*, 1998, 36, 305-311.

<sup>116</sup> Dixon, G.K; Copping, L. G; Hollomon, D. W. *Antifungal agents: discovery and modes of action*, Oxford, 1995.

mofo<sup>91</sup>. Ele resolveu observar o padrão de crescimento nas placas contaminadas e percebeu que havia uma área ao redor do mofo, onde a cultura de bactéria, *Staphylococcus aureus*, havia parado de crescer. Desta maneira Fleming observava um tipo de mofo, que podia inibir o crescimento da bactéria. O mofo foi mais tarde, identificado como o fungo *Penicillium notatum*. Em 1928, Fleming nomeou o inibidor ativo do mofo como *penicilina*. Após 1939, com o grande interesse na penicilina, René Dubos, um microbiologista francês, descobriu dois outros antibióticos chamados *gramicidina* e *tirocidina*<sup>91</sup>, ambos eram produzidos por uma bactéria, *Bacillus brevis*, isolada do solo.

Desde a primeira descoberta dos antibióticos, muitos compostos anti-microbianos foram estudados, mas são muito tóxicos para os seres humanos (matam os micróbios patogênicos, mas também prejudicam o hospedeiro infectado). Além disso, a resistência a fármacos resulta de uma resposta adaptativa dos microrganismos; eles podem produzir enzimas que inativam os antibióticos. Os fármacos anti-microbianos têm diferentes ações, como: inibição da síntese da parede celular da bactéria (penicilina); inibição da síntese protéica através da atuação nos ribossomas 70S (cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e estreptomicina); lesão das membranas plasmáticas (polimixina B); inibição da síntese de ácidos nucleicos (Rifampicina e as quinolonas); atuação como antimetabólitos pela inibição competitiva da atividade enzimática (sulfanilamidas, Figura 2).

Os antibióticos são utilizados comercialmente para outros fins que não o tratamento de doenças - por exemplo - como suplemento na alimentação de animais. Em comparação com organismos eucariontes, é relativamente fácil encontrar ou desenvolver fármacos que são efetivos contra células procarióticas (bactérias) e que não afetem as células eucarióticas humanas. Porém o problema é mais complicado quando o patógeno é uma célula eucariótica, tal como um fungo, pois ao nível celular, estes organismos assemelham-se à célula humana mais do que à célula bacteriana. O arsenal contra fungos patogênicos, é mais limitado do que o de fármacos antibacterianos.

Alguns fármacos possuem um largo espectro de atividade antimicrobiana, isto, em relação ao número de tipos microbianos diferentes que eles afetam, a vantagem dessa condição é a economia de tempo, mas em oposição, sua desvantagem é que uma grande parte da microbiota normal do hospedeiro é destruída pela ação destes anti-microbianos. Se determinados organismos na microbiota normal não são destruídos pelo antibiótico, seus competidores sobreviventes podem aumentar suas populações e tornarem-se patógenos oportunistas<sup>117</sup>. Um exemplo que acontece às vezes é o supercrescimento do fungo *C.albicans*, o qual não é sensível aos antibióticos antibacterianos. Este supercrescimento é denominado superinfecção, um termo que também é aplicado ao crescimento de patógenos-alvo que desenvolvem resistência ao antibiótico. Os agentes anti-microbianos são bactericidas - matam o micróbio diretamente, ou bacteriostáticos - impedem o crescimento do micróbio (Tabela 3).

---

<sup>117</sup> Colombo, A. L.; Guimarães, T., *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2003, 36, 599.

Tabela 3: Alguns antibióticos em uso atualmente<sup>41</sup>.

Microrganismos		Antibióticos
<b>Bacillus Gram-Positivos</b>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus polymyxa</i>	Bacitracina Polimixina
<b>Actinomicetos</b>	<i>Streptomyces nodosus</i> <i>Streptomyces venezuelae</i> <i>Streptomyces aureofaciens</i> <i>Streptomyces erythraeus</i> <i>Streptomyces fradie</i> <i>Streptomyces griseus</i> <i>Micromonospora purpurea</i>	Anfotericina B Cloranfenicol Clortetraciclina e Tetraciclina Eritromicina Neomicina Estreptomicina Gentamicina
<b>Fungos</b>	<i>Cephalosporium Spp.</i> <i>Penicillium griseofulvum</i> <i>Penicillium notatum</i>	Cefalotina Griseofulvina Penicilina

Como o avanço do conhecimento do mecanismo de ação dos fármacos, o planejamento racional de novos fármacos antimicrobianos pela compreensão da interação fármaco-receptor a nível molecular realizado em computadores tende a ser cada vez mais efetivo e, portanto de grande importância. Com relação ao desenvolvimento de novos tipos de agentes antifúngicos há muitos exemplos<sup>118</sup>, tais como esteróides; inibidores de acetil-CoA carboxilase de fungos; derivados antitubulínicos; derivados equinocandínicos; estrobilurinas; derivados aminopiridínicos e derivados fenilpirrólicos, todos estão ilustrados na Figura 31.

Contudo, destacam-se, também, os exemplos de fármacos que interagem com o DNA como o Metalaxyl ®<sup>119</sup> (Figura 30), típico agente de alquilação de DNA e o LY214352<sup>120</sup> (8-cloro-4-(2-cloro-4-fluorofenoxi)quinolina) (Figura 30), típico agente intercalante de DNA, que mostram a potencialidade destes novos agentes, inicialmente usados como antitumorais para aplicação como antifúngicos.

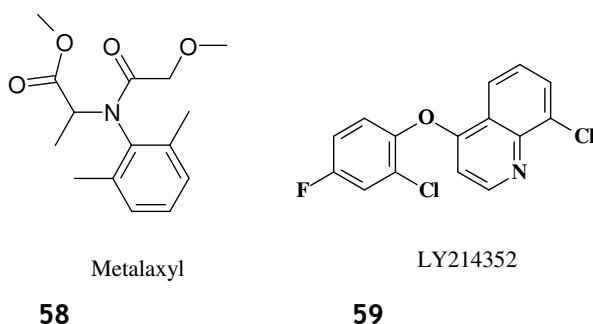


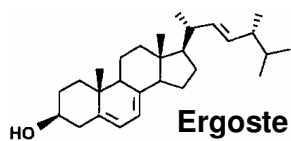
Figura 30: Fármacos que interagem com o DNA: Metalaxyl e LY214352.

<sup>118</sup> Dixon, G. K.; Copping, L. G.; Hollomon, D. W. *Antifungal Agents: Discovery and Mode of Action*, Oxford, 1995.

<sup>119</sup> <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr09.htm> (Acessado em: 13/07/08).

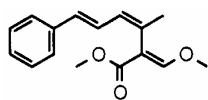
<sup>120</sup> Gustafson, Gary. UK. Editor(s): Dixon, G. K.; Copping, Leonard G.; Hollomon, Derek W. *Antifungal Agents: Discovery and Mode of Action*, (Papers presented at the Conference The Discovery and Mode of Action of Antifungal Agents), Grantham, Reino Unido 1995, 11-12, 111-117.

Esteróide



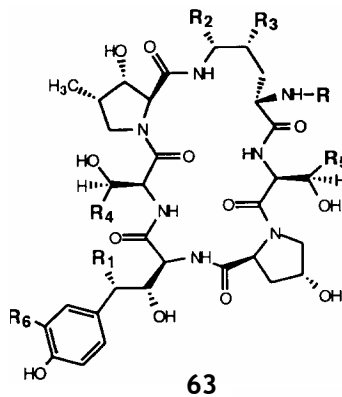
60

Estrobilurina A



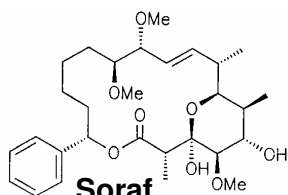
61

Estrutura geral  
Equinocandínicos



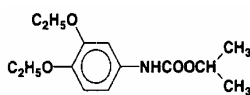
63

Inibidor acetil-CoA

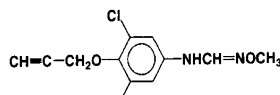


62

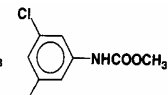
Agentes anti-tubulínicos



64

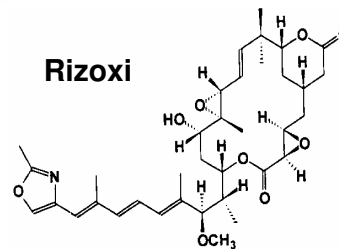


65 DC



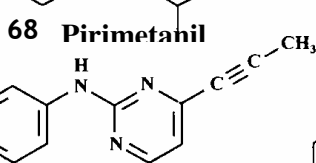
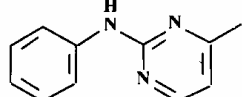
66 MD

Rizoxi

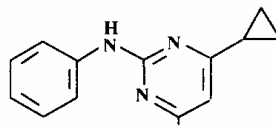


67

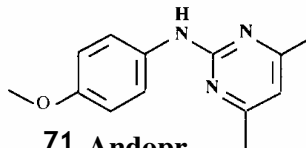
Derivados aminopiridínicos



70 Menanini

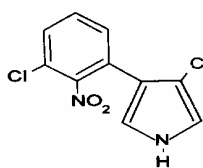


69 Cinrodi

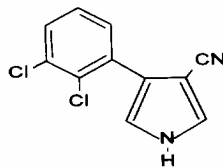


71 Andorr

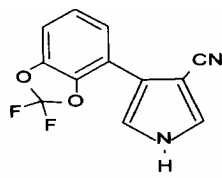
Derivados Fenilpirrólicos



72 Pirrolnit



73 Fennicio



74 Fludioxo

Figura 31: Novos agentes antifúngicos.

Além disso, moléculas que apresentam interações específicas com a fenda menor do DNA têm despertado interesse como potenciais agentes terapêuticos em uma variedade de doenças humanas além de câncer<sup>121,122</sup>. Dentro deste tipo de molécula que interage com o DNA, destacamos os derivados simétricos e poli-funcionalizados com grupos amidínicos e bioisósteros que interagem fortemente com o DNA por interações eletrostáticas e que têm sido estudados como potenciais antifúngicos pelo nosso grupo de pesquisas<sup>19,57,58</sup>. Em particular o grupo funcional tioureído, ou melhor, S-tioureído (R-S-C(=NH)NH<sub>2</sub>.HCl) sendo este um grupo que está carregado positivamente em pH fisiológico e considerado bioisostérico ao grupo amidina (R-C(=NH)NH<sub>2</sub>.HCl), também protonada nesse meio.

Desde que se tornou de interesse o estudo da ação antimicrobiana de derivados tipo tioureído, uma investigação na literatura demonstrou que há vários exemplos. Destaca-se o estudo feito por Cameron e colaboradores<sup>123</sup> no qual descreveu a síntese e o estudo da atividade fungicida de compostos organofosforados substituídos por grupos bioisostéricos de amidina (Figura 32). Estes pesquisadores sintetizaram derivados tioureídico-fosfônicos e testaram a atividade fungicida destes compostos contra fungos que atacam as plantações de arroz obtendo atividade inibitória na faixa de 75% no controle de fungos das espécies *Drechslera ssp.* e *Rhizoctonia solani*.

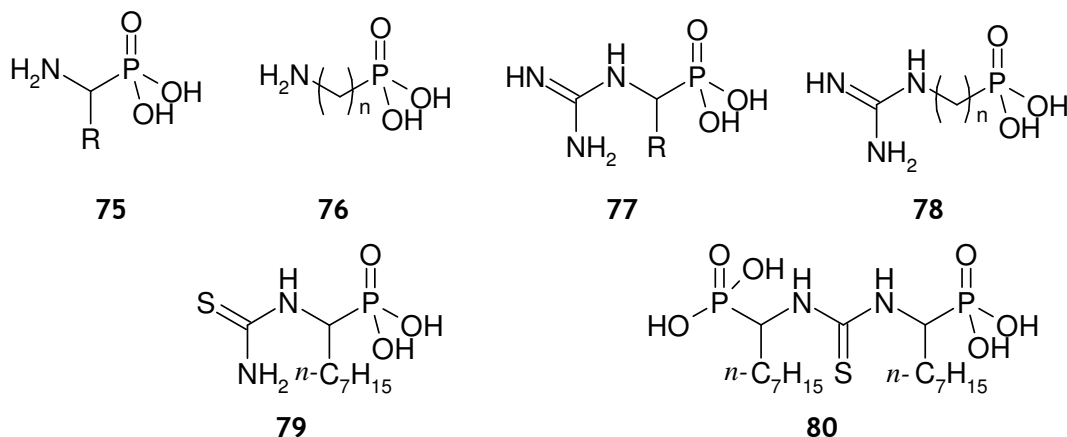


Figura 32: Compostos estudados por Cameron e colaboradores.

O trabalho de Supuran e colaboradores<sup>124</sup> destaca a atividade antifúngica de derivados tioureído-substituídos de 2-aminofenoxatiina (Figura 33 e Tabela 4). Estes compostos apresentaram potencial antifúngico contra *Aspergillus* e *Candida*, sendo que foram estudadas duas espécies de *Aspergillus spp.* (*A. niger* e *A. flavus*) e uma de *Candida spp.* (*C. albicans*), onde o precursor 2-aminofeno xatiina não apresentou atividade antifúngica contra nenhuma das três espécies estudadas, enquanto os derivados uréia/tioureia exibiram diferentes graus de atividade.

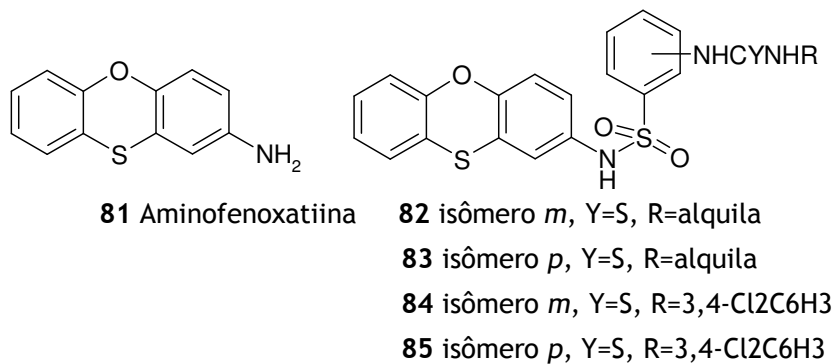
<sup>121</sup> Neidle.S., *Nat..Prod. Rep.*, 2001, 18, 291.

<sup>122</sup> Henderson, D.; Hurley, L. H. , *Nat. Med.*, 1995, 6, 525.

<sup>123</sup> Cameron, D. G.; Hudson, H. R.; Pianka, M., *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 1993, 83, 21.

<sup>124</sup> Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Jurca, B. C.; Ilies, M. A., *Eur. J. Med. Chem.* ,1998, 33, 83. Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Briganti, F.; Loloïu, G.; Maior, O., *Eur. J. Med. Chem.*. 1998, 33, 821.



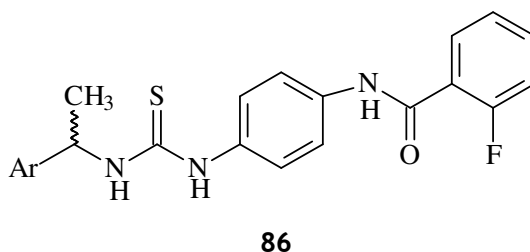


**Figura 33:** Alguns dos compostos com atividade antifúngica testada por Supuran e colaboradores.

**Tabela 4:** Alguns dos compostos com atividade antifúngica testada por Supuran e col.

Composto	<i>A. flavus</i> C1150 (µg/mL)	<i>A. niger</i> C418 (µg/mL)	<i>C. albicans</i> C316 (µg/mL)
<b>82</b>	0,8	1,5	1,4
<b>83</b>	1,2	1,6	1,1
<b>84</b>	0,4	0,8	0,5
<b>85</b>	0,9	0,9	0,6

Grandi e colaboradores<sup>125</sup> descreveram a atividade de compostos tipo tiouréia N,N-dialquil-substituída na inibição de vírus da herpes. Eles estudaram e sintetizaram compostos que possuem três anéis aromáticos com os grupo uréia- e tioureia-derivados entre estes anéis (Figura 34), esses compostos mostraram grande atividade contra o vírus da herpes.



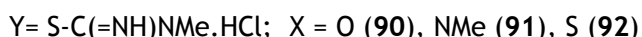
**Figura 34:** Estrutura geral dos compostos testados contra o vírus da herpes por Grandi e colaboradores.

<sup>125</sup> Grandi, M. J. D.; Curran, K. J.; Feigelson, G.; Prasad, A.; Ross, A. A.; Visalli, R.; Fairhurst, J.; Field, B.; Blom, J. D., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, 14, 4157.

## I.4-ESTUDO DE PRECURSORES DENDRÍMICOS

### I.4.a - Estudo da Atividade Antifúngica de Precursores Dendrímicos

Trabalhos recentes em nosso grupo de pesquisa, o **LASELORG-QUIM** (Laboratório de Síntese e Eletrossíntese Orgânica e Química Medicinal)<sup>126</sup> têm comprovado que a atividade antifúngica de compostos do tipo tioureído é influenciada pela inserção de grupos metílicos na porção tioureído da cadeia (Figura 35).



Potência contra: *Candida albicans*: 90 > 87, 91 > 88, 92 > 89

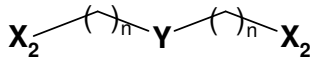
*C. glabrata*: 90 > 87

*C. krusei*: 92 > 89

**Figura 35:** Estrutura e atividade anti-fúngica contra *Candida spp.* de derivados tioureído estudados com a variação do grau de alquilação.

Nesses estudos também têm-se comprovado que a atividade antifúngica de compostos funcionalizados do tipo tioureído é aumentada pela diminuição da flexibilidade molecular<sup>126</sup>. Além disso, análises de QSAR realizadas comprovaram que os resultados obtidos sobre a atividade antifúngica dos compostos tioureído e N-metil-tioureído substituídos estudados em duas dissertações de mestrado anteriores estimularam uma análise quimiométrica geral. Para facilitar a compreensão dos resultados alterou-se a denominação dos compostos conforme a Tabela 5, a seguir.

**Tabela 5:** Derivados tipo precursores dendrímicos (PD) funcionalizados estudados por PCA.

ESTRUTURA GERAL			
PD1 (Me-NMe)	n = 2	Y = NCH <sub>3</sub>	X <sub>2</sub> : S-C=NH(NHCH <sub>3</sub> )
PD2 (Me-S)	n = 3	Y = S	
PD3 (Me-SO <sub>2</sub> )	n = 3	Y = SO <sub>2</sub>	
PD4 (Me-SO)	n = 3	Y = SO	
PD5 (Me-O)	n = 2	Y = O	
PD6 (O)	n = 2	Y = O	X <sub>2</sub> : S-C=NH(NH <sub>2</sub> )
PDA (S)	n = 3	Y = S	X <sub>2</sub> : S-C=NH(NH <sub>2</sub> )
PDC (NMe)	n = 2	Y = NCH <sub>3</sub>	
PDD (SO <sub>2</sub> )	n = 3	Y = SO <sub>2</sub>	
PDE (SO)	n = 3	Y = SO	

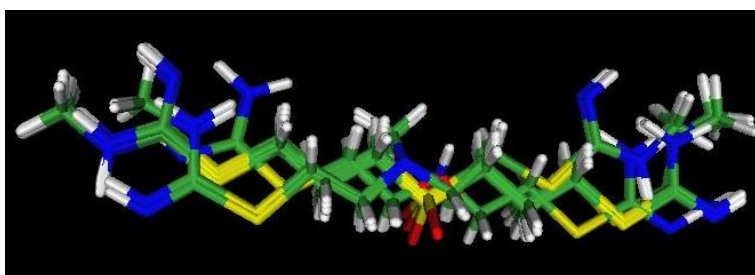
<sup>126</sup> Silva, L. L.; Donnici, C. L.(coord.) Dissertação de Mestrado, Departamento de Química da UFMG, 2005; Nogueira, L. J.; Donnici, C. L.(coord.) Dissertação de Mestrado, Departamento de Química da UFMG, 2006.

As estruturas moleculares destes derivados (**PD1** a **PD6**) foram sobrepostas e alinhadas segundo o momento de inércia, conforme Figura 36. A partir daí foram calculados 30 descritores físico-químicos presentes no programa TSAR<sup>®</sup> (forma, flexibilidade, conectividade e ADME). Após a análise da matriz de correlação, os descritores altamente correlacionados foram eliminados. Ao final desta análise, computacionalmente realizou-se uma Análise de Componentes Principais (PCA) gerando uma matriz com 14 descritores que foi usada para estudos quimiométricos e, então, foi gerada uma matriz de dados que foi reduzida a três variáveis que foram usadas na geração final do modelo quimiométrico. O PCA realizado nos derivados **PD1** a **PD6** e **PDA** a **PDE** mostra o modelo final (Figura 37), que foi descrito com três componentes que explicam 100 % da variação total dos dados (**PC1**: 56%, **PC2**:88% e **PC3**: 100%).

O gráfico de “score” e de pesos (círculo) (Figura 37) representa as duas primeiras componentes que apresentam uma maior explicação da variação total dos dados (88%), porém a **PC1** é a componente capaz de discriminar os compostos em dois grupos distintos: um (à esquerda) contendo os derivados menos lipofílicos (os derivados não-metilados) e o outro (à direita) com os derivados mais lipofílicos, tipo N-metil-S-tioureido. Os parâmetros físico-químicos conhecidos como flexibilidade molecular (**X1**), índice topológico de Balaban (**X2**) e coeficiente de partição ou log P (**X3**) foram capazes de promover o reconhecimento molecular pela separação observada. Assim, o reconhecimento molecular é expresso pela Equação 2, a seguir:

$$\text{PC1} = -0,36 \cdot \text{X1} + 0,64 \cdot \text{X2} + 0,88 \cdot \text{X3} - 8,06 \quad \text{Equação 2}$$

**X1**= Flexibilidade molecular; **X2** = índice Balaban, **X3** = log P



**Figura 36:** Alinhamento molecular das estruturas dos derivados tipo tioureido estudados.

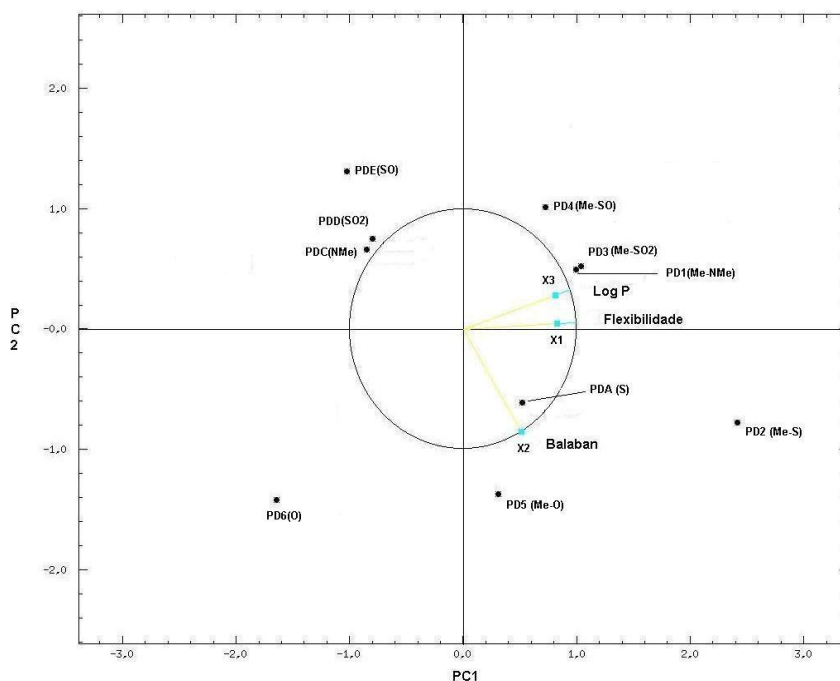


Figura 37: Análise de PCA obtida pelo programa TSAR®.

A Equação 2 sugere que as modificações moleculares efetuadas levem ao aumento da lipofilia (X3, log P positivo), ao aumento da rigidez ou diminuição da flexibilidade molecular (X1, flexibilidade molecular negativa), mas que não ocorram grandes alterações na topologia molecular e que haja aumento no volume molecular (X2, índice de Balaban positivo) para que haja aumento na atividade farmacológica dos novos análogos propostos.

Além disso, estes mesmos trabalhos comprovaram a interação com o DNA, por *ITC* (“*Isothermal Titration Calorimetry*”) <sup>127</sup> e por biossensor de DNA <sup>126</sup> de PDA a PDE (Tabela 5). Desta maneira, estas novas entidades químicas (*NCE*) se mostraram potenciais fármacos com aplicação como agentes antitumorais e antifúngicos. Destaca-se, o composto PDC que demonstrou grande potencialidade como agente antitumoral, pois apresenta significativa interação com o DNA sintético dodecâmero d(CGCGAATTCGCG).

Ademais, em âmbito científico geral o LASELORG-QUIM tem se empenhado neste grande interesse da descoberta de novos agentes farmacológicos - ou *NCE* potencialmente bioativas - para o tratamento de doenças diversas que vêm apresentando crescente incidência e resistência aos fármacos usuais, tais como o câncer <sup>128</sup> e as doenças infecciosas emergentes (DIEs) ou

<sup>127</sup> Donnici, C. L.; Silva, Láuris Lúcia da; Goulart, Marília Oliveira Fonseca; Abreu, Fabiane Caxico de; Montanari, Carlos Alberto; Paula, Francine S de. Investigação eletroquímica da interação de agentes antitumorais eletrofílicos e amidínicos com DNA. In: 28a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas. Livro de Resumos da 28a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - MD, 2005. v. 1. p. 66-66.

<sup>128</sup> Almeida, V. L.; Leitão, A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P.; Montanari, C. A., *Quim. Nova*, 2005, 25, 118.

infecções fúngicas invasivas (IFIs)<sup>129</sup>, doenças já foram apresentadas com breves textos introdutórios.

O nosso interesse por compostos do tipo tioureido se deve a estes bons resultados de teste de atividade biológica aliados aos estudos de QSAR. Além disso, especialistas afirmam que estes compostos amidino-funcionalizados são excelentes modelos protótipos para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos que tenham o seu mecanismo de ação relacionado com o DNA<sup>38,127</sup>. Na literatura só há um estudo publicado destacável sobre a atividade antitumoral de derivados simétricos tipo amina polifuncionalizada com grupos bis-catiônicos, amidinas bioisostéricas, o estudo de Gergely e colaboradores<sup>130</sup>. Neste, foi relatada a inibição da apoptose (PCD) por um composto tioureídico S-alkil-substituído, a tris-(2-tioureido)-S-etilamina (P1, Figura 49). Estes autores estudaram as propriedades reguladoras PCD deste composto, similar ao imunotiol (sódio-dietil-ditiocarbamato), que se mostrou ativo contra células humanas com leucemia, HL-60 e U-937, evidenciando a potencialidade destes derivados como antitumorais. Este trabalho, além de corroborar a provável potencialidade de nossos compostos-protótipos como antineoplásicos, mostra que moléculas simétricas e simples - e que podem ser caracterizadas como precursores dendriméricos também podem ser bioativas. Além do mais, este estudo indica um bioisóstero da amidina de síntese fácil: o grupo tioureído, que é muito comum em síntese de compostos organossulfurados, mas pouco estudado quanto à atividade farmacológica.

Os compostos tipo PD estudados pelo nosso grupo são simétricos, polifuncionalizados por grupos bioisósteros do grupo amidina (tais como o grupo tioureido) e presença de grupos catiônicos, e, como já citado, também possuem grande potencialidade de interação com o DNA.

#### I.4.b- Determinação do log $k_w$ de Precursores Dendríméricos

Visando-se a determinação experimental de log P, ou coeficiente de partição, é possível utilizar a técnica usada internacionalmente e recomendada pela Organização Mundial de Saúde<sup>131</sup>, RP-HPLC. A retenção no HPLC é considerada como um processo de equilíbrio dinâmico, na qual a constante de equilíbrio  $K_R$  para o processo, pode ser descrita como:

$$\ln K_R = -\Delta G_R/RT \quad \text{Equação 3}$$

onde  $\Delta G_R$ , R e T são a variação da energia livre de Gibbs para a retenção, a constante dos gases e a temperatura absoluta, respectivamente. A retenção é quantitativamente descrita pelo fator de capacidade, k, dado pela retenção normalizada do tempo através da Equação a seguir:

$$K = (t_r - t_0) / t_0 \quad \text{Equação 4}$$

onde  $t_r$  é o tempo de retenção do soluto retido e  $t_0$  é o tempo de retenção da fase móvel. O fator de capacidade é um parâmetro fundamental para a comparação dos dados de retenção e a quantificação do fenômeno físico-químico da lipofilia em termos de relação linear de energia

<sup>129</sup> Lai, Chih-Cheng; Tan, Che-Kim; Huang, Yu-Tsung; Shao, Pei-Lan; Hsueh, Po-Ren., *J. Infec. Chemother.*, 2008, 14(2), 77-85.

<sup>130</sup> Nagy, E.; Mihalik, R.; Hraák, A.; Vértesi, C.; Gerlely, P., *Immunopharmacology*, 2000, 47, 25.

<sup>131</sup> Tavares, L. C., *Quím. Nova*, 2004, 27, 63.

livre. Deve-se lembrar que o coeficiente de partição é medido pela razão da solubilidade/concentração do composto estudado na fase orgânica pela concentração na fase aquosa, sendo assim se considera a quantificação da migração do soluto da fase apolar para uma fase polar aquosa, que é a base da metodologia “*shake-flask*”<sup>30,31</sup>. No caso da teoria envolvida na partição por HPLC é investigada a influência do aumento da polaridade do agente modificador (fase móvel) sobre o tempo de retenção de compostos-padrão que já têm o log P determinado pelo “*shake-flask*”, ou seja, avalia-se a migração deste da fase estacionária (apolar) para a fase móvel polar, como no “*shake-flask*”, o que deve ocorrer quando há 0% do agente modificador para 100% da fase aquosa. Assim, primeiramente é feito uma série de medidas experimentais com os tempos de retenção medidos em seis diferentes concentrações ou proporções de metanol/tampão MOPS, variando de 75 : 25 (vol/vol) até 25: 75 (vol/vol), com a finalidade de determinar o tempo de retenção e, a partir deste, o fator de capacidade (K) de cada composto em um determinado comprimento de onda máximo.

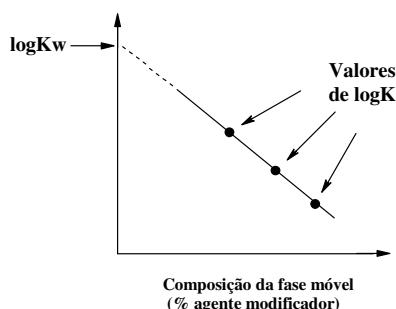
Com os diversos valores de log k obtidos em diversas concentrações do agente modificador tem-se a correlação entre log k e a composição da fase móvel ( $\varphi$ ) que fornece informações a respeito destes efeitos seletivos e conseqüentemente sobre a lipofilia dos padrões. Este é, portanto, o processo responsável pela retenção do soluto na fase estacionária apolar, que pode ser vista como um processo de associação reversível entre as cadeias de hidrocarbonetos da fase estacionária e as partes apolares do soluto<sup>132</sup>. O agente modificador (solvente orgânico que compõe a fase móvel juntamente com a água), exerce um efeito seletivo, principalmente na retenção de solutos polares<sup>154</sup>.

Neste intervalo de concentrações há um comportamento linear que pode ser vista como uma boa aproximação, como:  $\log k = S\varphi + \log k_w$  **Equação 6**

Assim sendo, mediram-se os tempos de retenção dos vinte compostos padrão estudados em solução de metanol / tampão MOPS a pH 7,2, em seis diferentes proporções, variando de 75 / 25 até 25 / 75. Desta forma, os efeitos seletivos das interações entre soluto-solvente podem ser eliminados através da determinação do fator de capacidade em fase móvel isenta de agente modificador, log  $k_w$ . Entretanto os tempos de retenção correspondentes para de log  $K_w$  são muito altos para serem obtidos experimentalmente, mas podem ser calculados usando técnicas de extrapolação. Determina-se o log K para o soluto em diversas concentrações do agente modificador e o log  $K_w$  pode ser determinado na extrapolação para 100% de água (Figura 38).

---

<sup>132</sup> Wells, M. J. M.; Randall C. C.; Patterson, R. M., *J. Chromatogr.*, 1982, 235, 43. Tanaka, N.; Goodel, H.; Karger, B. L., *J. Chromatogr.*, 1978, 158, 233. Tanaka, N.; Sakagami K.; Araki, M., *J. Chromatogr.*, 1980, 199, 327. Miyake K.; Misuno, M.; Terada, H., *J. Chromatogr.*, 1988, 439, 227.



**Figura 38:** Representação esquemática da medida de parâmetro de lipofilia por RP-HPLC, da medida de valor de log k e da extrapolação para obtenção de log kw

A utilização de  $K_w$  como parâmetro lipofílico foi evidenciada pela primeira vez por Hulshoff<sup>133</sup> para uma série de benzodiazepinas. Recentes estudos mostram fortes evidências que  $\log k_w$  está mais intimamente correlacionado com  $\log P$  que os fatores de capacidade obtidos isocriticamente, pois assemelha-se mais ao método de “shake-flask”. Assim, efetuou-se a construção de um gráfico entre os valores de  $\log K_w$  obtidos e os valores de  $\log P_{oct}$  (dos padrões) discutidos na literatura (Figura 39).

Cabe ressaltar que Sinanoglu<sup>134</sup> e Horváth e col.<sup>135</sup>, de fato, estabeleceram fundamentos teóricos sobre o fato do  $\log k$  poder ser considerado como parâmetro lipofílico e como já citado, obterem-se coeficientes de partição correlacionados através da equação de Collander, ou seja, se para os padrões usados há correlação entre o coeficiente de partição conhecido na literatura e os parâmetros lipofílicos determinados por HPLC, pode-se inferir que estes últimos podem ser realmente usados como medida de avaliação de lipofilia. É digno de nota que há diversos e bem sucedidos trabalhos correlacionando o parâmetro hidrofóbico ( $\log K$ ) com a atividade biológica de um determinado composto<sup>136</sup>, incluindo a avaliação de influência de  $\log P$  na atividade antitumoral de compostos mesoiônicos diversos realizadas pelo nosso grupo<sup>19</sup>, que justificam o uso da RP-HPLC como instrumento valioso em estudos de QSAR. Cabe destacar que os descritores físico-químicos  $\log K$  e  $\log P$  estão fortemente correlacionados<sup>137</sup>, como comprovado pelas relevantes correlações entre  $\log K$  e  $\log P$  encontradas na literatura.

<sup>133</sup> Hulshoff, A.; Perrin, S.H., *J.Chromtogr.*, 1976, 129, 263.

<sup>134</sup> Sinanoglu, O., *Molecular Association in Biology*, Nova Iorque, p.147, 168.

<sup>135</sup> Horváth, C., Melander, W., Nahum, A., *J. Chromtogr.*, 1979, 186, 371. Horváth, C., Melander, W., Molnar., *J. Chromtogr.*, 1976, 125, 129.

<sup>136</sup> Baker, J. K.; Rauls, D. O.; Borne, R. F.; *J. Med. Chem.* 1979, 22, 1301; Bienganowska, M., *J. Liq. Chromatogr.*, 1982, 5, 39. Bienganowska, M.; *Chromatographia*, 1984, 18, 456. Jinno, K., *Anal. Lett.*, 1984, 17, 183. Wells, M. J. M.; Clark, C. R.; Patterson, R. M., *J. Chromatogr. Sci.*, 1981, 19, 573. Henry, D.; Block, J. H.; Anderson, J. L.; Carlson, G. R., *J. Med. Chem.*, 1976, 19, 619.; Britto, M.M.; Montanari, C. A.; Donnici, C.L.; Cass, Q. B., *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 1999, 22, 357; Britto, M.M., *Tese de doutorado*. Universidade Federal de Minas Gerais, Dezembro, 2000.

<sup>137</sup> Braumann, T.; Grimme, L. H., *J. Chromatogr.*, 1981, 206, 7.

Obtendo-se com os padrões estudados uma boa correlação entre os valores de  $\log K_w$  e  $\log P$ , estes dados sugerem que se pode utilizar esta metodologia e estes padrões para a determinação experimental de  $\log P$  de compostos desconhecidos.

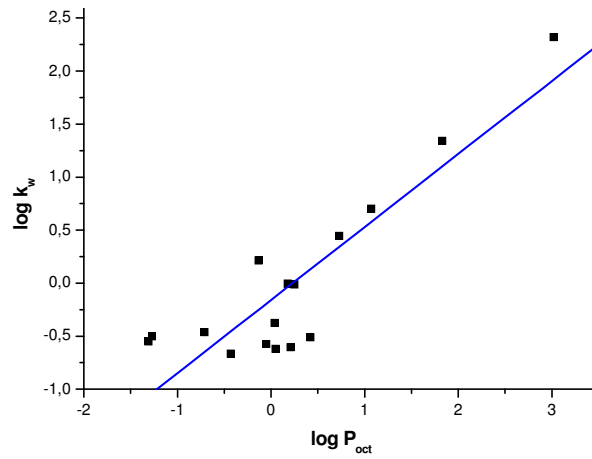


Figura 39: Correlação entre  $\log k_w$  e  $P_{oct}$  para os padrões cromatográficos.



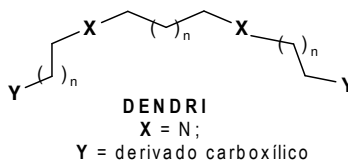
## II. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

A necessidade no âmbito da saúde pública frente ao grave problema advindo do grande e crescente número de pacientes com câncer, além do crescimento das DIEs e das IFIs justificam a constante busca de *NCEs* que possam ser compostos-líderes para gerarem possíveis compostos-protótipo para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais e antifúngicos.

Nesta perspectiva, os compostos tioureido-funcionalizados, sintetizados e estudados dentro do **LASELORG-QUIM** - com o objetivo de desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos e antifúngicos mais eficientes e menos tóxicos - têm se mostrado como novos compostos-protótipo de potência cada vez mais elevada. Cabe ressaltar que estes compostos com grupos S-tioureido são preparados facilmente a partir da reação de haletos de alquila (RX) com excesso de tiouréia ( $\text{NH}_2\text{C}(=\text{S})\text{NH}_2$ ), ou derivados de tiouréia, em etanol ou isopropanol, aquecidos a refluxo. Contudo, este grupo funcional tioureido é geralmente usado só como intermediário sintético para obtenção de grupos tióis (ou mercaptanas) pelo tratamento com hidrólise alcalina e acidificação.

Desta forma é de grande interesse científico a continuação de tais investigações com a síntese e o estudo da atividade antifúngica e antitumoral de novos derivados (Figura 40) lembrando que tais espécies devem ter similaridade molecular, maior grau de alquilação, maior lipofilia e menor flexibilidade molecular. Assim, pode-se também investigar a influência da maior ramificação e simetria em moléculas como as descritas a seguir e a presença de outros grupos bioisostéricos, tais como amidina e outros.

Cabe ressaltar, que a execução deste projeto é ainda mais justificável pelo fato de que recentemente, uma molécula do tipo precursor dendrimérico (**DENDRI**) desenvolvida por nosso grupo foi submetida a testes antitumorais pelo grupo da Profa. Míriam Lopes do ICB-UFMG (colaboradora deste projeto) e a atividade foi constatada no excelente nível de  $10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup>, o que nos leva ao patenteamento desta nova molécula.



**Figura 40:** Estrutura geral do composto com atividade antitumoral.

Assim, pode-se racionalizar as modificações moleculares propostas, baseados no composto-protótipo os compostos bis-catiônicos tipo PD estudados em dissertações anteriores (Tabela 5). Os compostos propostos para esta dissertação seguem o esquema retrosintético descrito na Figura 41.

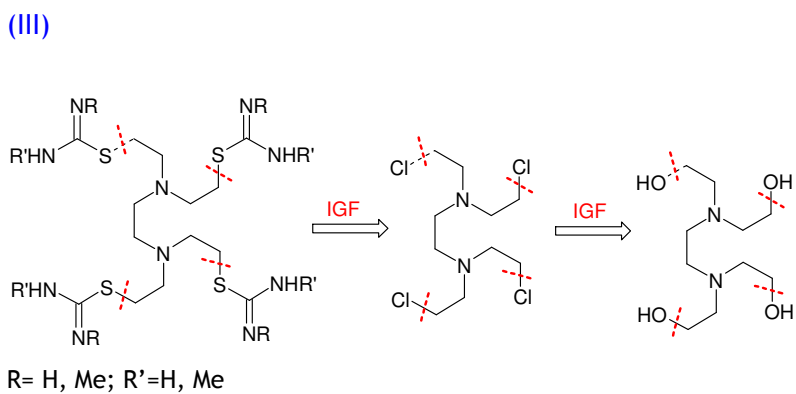
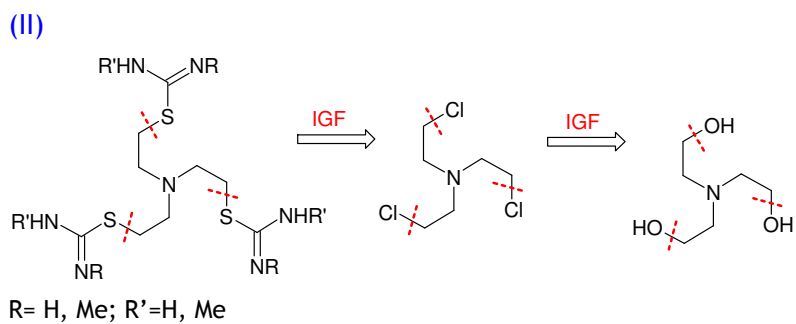
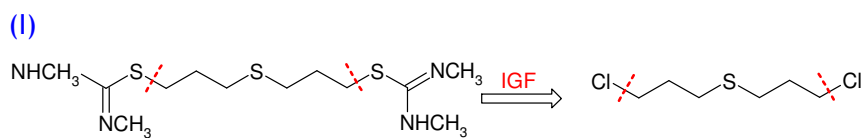


Figura 41: Retrossíntese para obtenção dos compostos estudados.

### III. OBJETIVOS

O objetivo geral dos estudos realizados nesta dissertação é o desenvolvimento de novos compostos-protótipo que sejam potencialmente agentes quimioterapêuticos para câncer e para o tratamento de doenças infecciosas emergentes (DIEs) ou infecções fúngicas invasivas (IFIs).

Com estas metas gerais, os objetivos específicos são resumidos como a seguir:

- a) Síntese, isolamento e caracterização espectrométrica de novos derivados precursores dendriméricos do tipo bis-, tris- e tetra-tioureído de **P1** (único já conhecido na literatura) a **P6**, propostos por planejamento racional por métodos de QSAR e Modelagem Molecular feitos anteriormente;

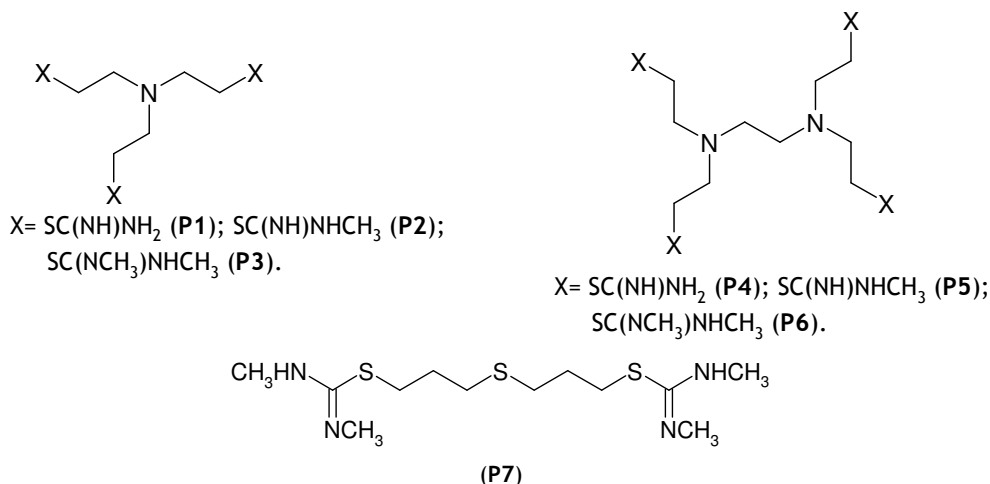


Figura 42: Estrutura geral dos compostos preparados.

- b) Avaliação da lipofilia pela medida do coeficiente de partição (Log P) - utilizando cromatografia líquida em fase reversa: RP-HPLC;
- c) Estudo da atividade anti-fúngica “in vitro” (determinação de MIC) de todos os derivados sintetizados (Profa. Ma. Aparecida Resende - ICB, colaboração) contra *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*), *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae*;
- d) Estudo da atividade anti-tumoral dos compostos **P1** e **P2** contra algumas linhagens tumorais: adenocarcinoma gástrico humano (AGS), carcinoma de cólon murino (CT26WT), carcinoma mamário humano (MCF-7) e glioma de rato (C6) (Profa. Dra. Miriam Tereza Paz Lopes - ICB; colaboração).

## IV-RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *IV.1- Considerações Gerais*

Neste capítulo primeiramente serão discutidos os resultados obtidos na preparação e identificação estrutural dos produtos (IV, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT). Como já citado, os compostos são bis-, tris- e tetra-funcionalizados do tipo tioureido e são bioisómeros planejados racionalmente. Todos os tioureidos foram preparados a partir de seus respectivos precursores clorados na forma protonada e que por sua vez foram obtidos a partir dos hidróxi-derivados correspondentes pela reação com cloreto de tionila em excesso (Figura 42). Com exceção do derivado amino tri-funcionalizado composto **P1**, todos são inéditos na literatura científica. Na Tabela 6 são mostradas as estruturas detalhadas de cada um dos derivados estudados e são dados os nomes oficiais (IUPAC) de todos eles.

No item IV.3 apresentaremos resultados da avaliação da lipofilia pela medida do coeficiente de partição destes compostos, no seguinte descreveremos os resultados obtidos da investigação da atividade antifúngica e também da atividade antitumoral. Finalmente, cabe esclarecer que trazemos a correlação entre lipofilia e atividade farmacológica conjuntamente com a descrição dos resultados de atividade obtidos.

**Tabela 6:** Nomenclatura oficial dos compostos preparados nesta dissertação.

Estrutura	Sigla	Nomenclatura Oficial
$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_3$	PA	Tris-(2-cloroetil)amina
$[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2]$	PB	N,N,N',N' - Tetrakis (2-cloroetil)etilenodiamina
$\text{S}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$	PC	1,7-dicloro-3-tia-heptano
$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SC}(\text{NH})\text{NH}_2)_3$	P1	Tris(2-tioureidoetil)amina
$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SC}(\text{NH})\text{NHCH}_3)_3$	P2	Tris(2-(1-metil-2-tioureidoetil)amina
$\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SC}(\text{NCH}_3)\text{NHCH}_3)_3$	P3	Tris(2-(1,3-dimetil)-tioureidoetil)amina
$[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SC}(\text{NH})\text{NH}_2)_2]$	P4	N,N,N',N' - tetrakis (2-tioureidoetil)etilenodiamina
$[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SC}(\text{NH})\text{NHCH}_3)_2]$	P5	N,N,N',N' - tetrakis(2-metil-tioureido-etil)etilenodiamina
$[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SC}(\text{NCH}_3)\text{NHCH}_3)_2] \cdot 4\text{HCl}$	P6	N,N,N',N' - tetrakis(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)etilenodiamina
$\text{S}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SC}(\text{NCH}_3)\text{NHCH}_3)_2$	P7	1,7-bis-(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)-4-tia-heptano

## IV.2- Obtenção e Caracterização dos Compostos tioureido-substituídos

Para a preparação dos compostos finais desejados (P1-P7) do tipo amino-tioureido foram utilizados como precursores os seus respectivos derivados halogenados recém-preparados: tris(2-cloroetil)amina (PA) e N,N,N',N'-tetrakis-2-cloroetil-etilenodiamina (PB), os respectivos métodos de obtenção se encontram no item IV.2.a. Estes haletos de alquila foram submetidos à reação clássica de sulfuração (Figura 43) e de mecanismo bem caracterizado (Esquema 1) com os derivados tioureia, 1-metil-2-tioureia ou 1,3-dimetil-2-tioureia em proporção molar correspondente (bis-equimolar, tris-equimolar ou tetra-equimolar) em etanol ou isopropanol a refluxo, gerando por cristalização ou evaporação os derivados mencionados (rendimentos de 49 a 92%). A rota retrossintética planejada para a síntese desta classe de estruturas se encontra na Figura 42.

Os derivados preparados foram caracterizados por técnicas espectrométricas: infravermelho IV, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT.

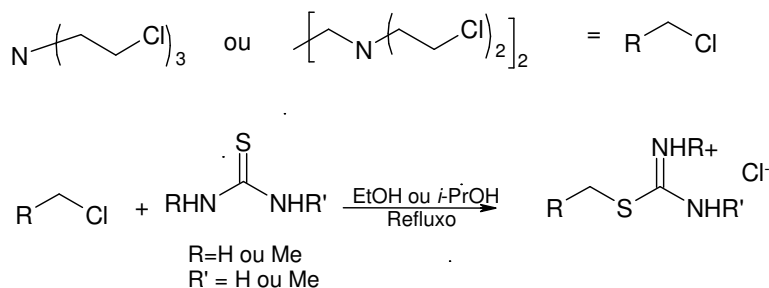
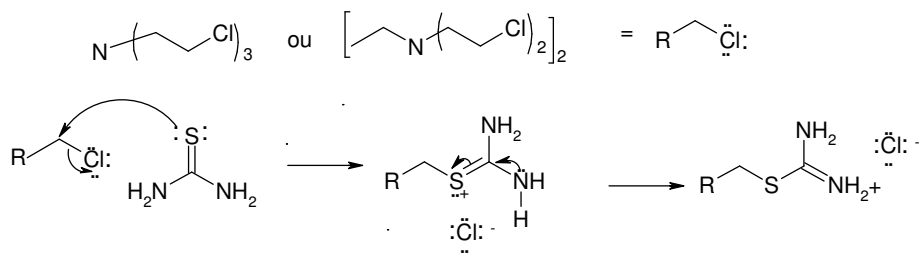


Figura 43: Reação geral para a síntese de tiureidos.



Esquema 1: Mecanismo geral de preparação de derivados tiureidos com tioureia.

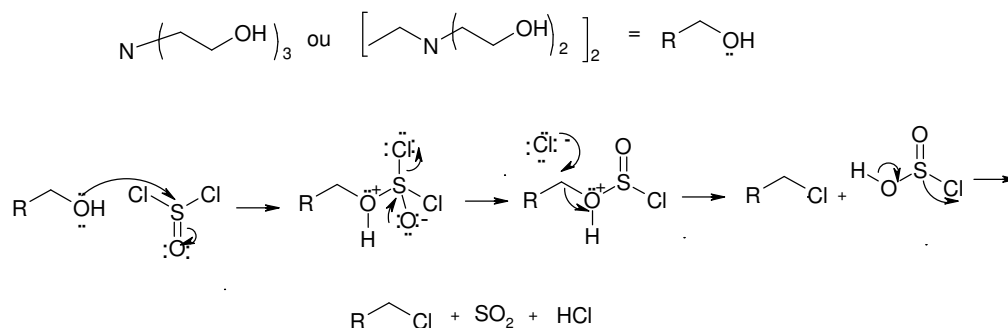
Nos itens a seguir serão discutidos detalhadamente tanto os métodos adotados para as respectivas preparações como a caracterização dos respectivos compostos.

#### IV.2.a-Obtenção de 2,2,2-triclorotrietilamina e N,N,N',N'-Tetrakis(2-cloroetil)etilenodiamina<sup>138</sup>

Os precursores tricloro- e tetra-cloro-substituídos - hidrocloreto de tris(2-cloroetil)amina (PA) e N,N,N',N'-tetrakis-2-cloroetil-etilenodiamina (PB) - foram preparados a partir da halogenação dos hidróxi-derivados correspondentes com cloreto de tionila em um procedimento já relatado na literatura e com mecanismo de reação bem conhecido (Esquema 1). Por exemplo, para obtenção de PA (Figura 44), executando-se a reação de tris-etanolamina com cloreto de tionila, respectivamente na proporção molar de 1:4 mol/mol, a reação inicia-se imediatamente, no entanto, completar-se é necessário agitação por 2 h, com rendimento de 59%.



Figura 44: 2,2,2-triclorotrietilamina (PA) e N,N,N', N'-Tetrakis (2-cloroetil) etilenodiamina (PB)



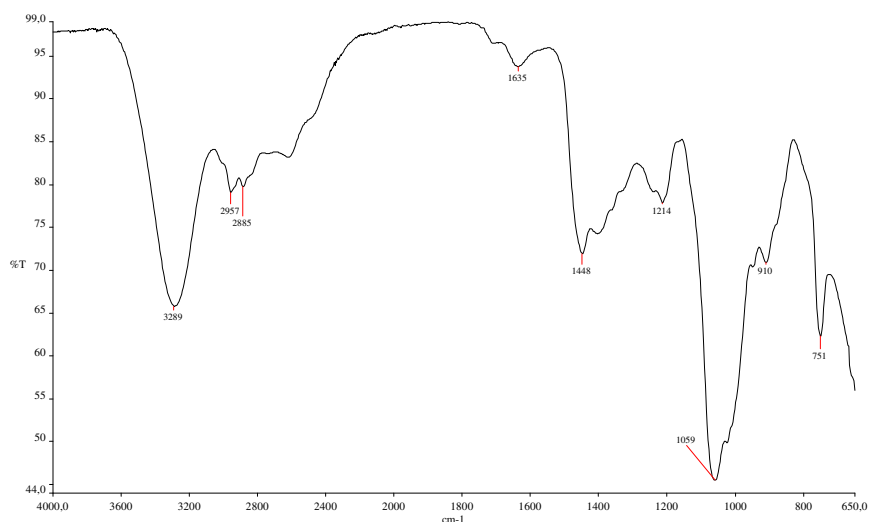
Esquema 2: Mecanismo geral de preparação dos haletos de alquila desta dissertação.

Quanto à caracterização destes produtos, os espectros na região do infravermelho (PA, Figura 52; PB, Figura 45) apresentam as seguintes bandas referentes à:

**PA:** 2974, 2940, 2887, 2832  $\text{cm}^{-1}$ : Def.axial de C-H<sub>2</sub>; 2470, 2423  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial (sim. e não-sim) N-H de amina terciária protonada; 1447, 1410  $\text{cm}^{-1}$ : Def. angular de CH<sub>2</sub>, 760  $\text{cm}^{-1}$ : Def.axial C-Cl.

**PB:** 3289  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial (não-sim. e sim.) N-H protonado; 2957, 2885  $\text{cm}^{-1}$  : Def. axial de C-H<sub>2</sub>; 1448  $\text{cm}^{-1}$ : Def. angular de C-H<sub>2</sub>, 751  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C-Cl.

<sup>138</sup> Ward, K. Jr., *Chlorinated triaryl amines* 1937, Patente n°:US2072348.

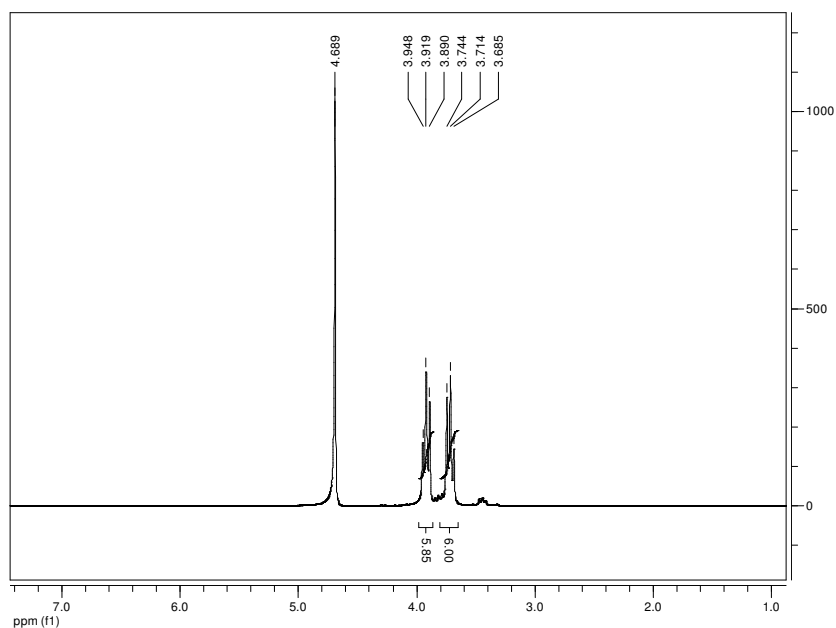


**Figura 45:** Espectro na região do infravermelho de PB.

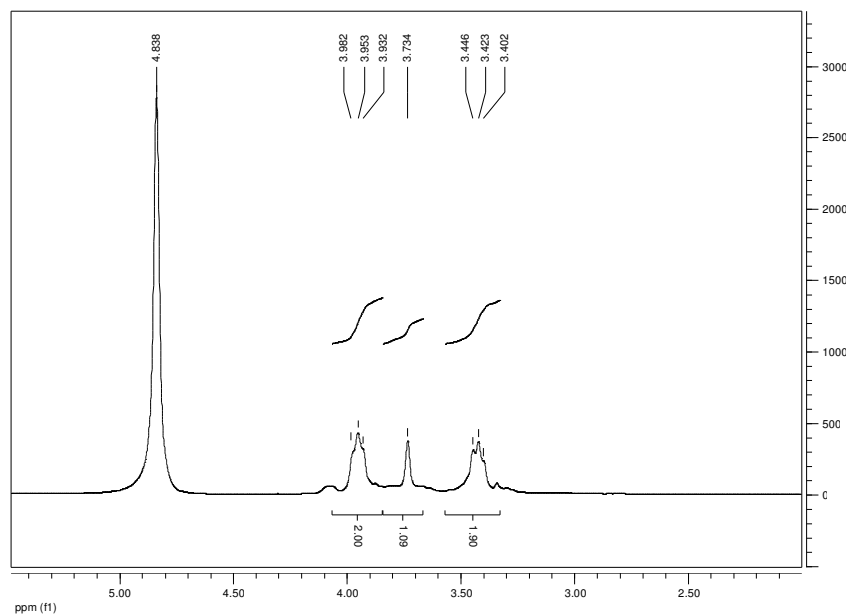
Pela análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foi possível identificar sinais referentes aos diferentes tipos de hidrogênios presentes nas respectivas moléculas de PA (Figura 46) e PB (Figura 47):

**PA:** tripleto em  $\delta$  3,71ppm ( $J^{1,2} = 6$ ) sinais relativos aos hidrogênios vizinhos ao átomo de cloro (H1), um tripleto  $\delta$  3,92 ppm ( $J^{2,1} = 6$ ) relativos aos hidrogênios vizinhos ao átomo de nitrogênio (H2).

**PB:** tripleto em  $\delta$  3,42 ppm ( $J^{1,2} = 5$ ), sinais relativos aos hidrogênios vizinhos ao átomo de cloro (H1), singleto em  $\delta$  3,73 ppm, relativo aos hidrogênios centrais (H3); tripleto 3,95 ppm ( $J^{2,1} = 5$ ) relativos aos hidrogênios vizinhos ao átomo de nitrogênio (H2).



**Figura 46:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de PA.

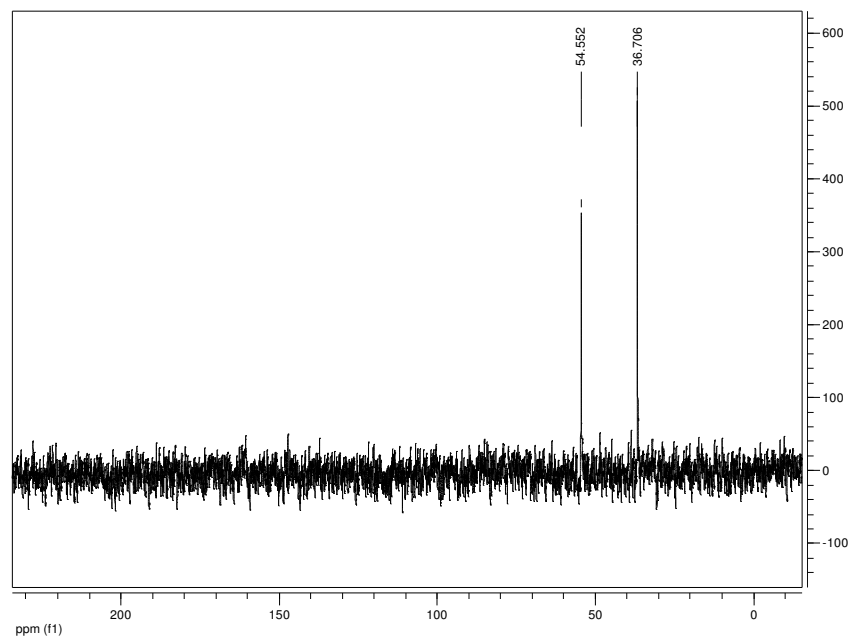


**Figura 47:** Espectro de RMN 1H de PB.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi possível atribuir quais os sinais correspondem aos três tipos de carbonos magneticamente não-equivalentes presentes (Figura 48 e Figura 49):

**PA:**  $\delta$  36,71 ppm: sinal relativo ao carbono  $\alpha$ -cloro-(C1),  $\delta$  54,55 ppm: sinal relativo ao carbono  $\alpha$ -amino- (C2).

**PB:**  $\delta$  48,34 ppm: sinal relativo ao carbono  $\alpha$ -cloro-(C1);  $\delta$  55,65 ppm: sinal relativo ao carbono  $\alpha$ -amino- (C2) e  $\delta$  55,35 ppm: sinal relativo ao carbono da parte etilendiamina (C3). O sub-espectro DEPT (Figura 49) feito para **PA** e **PB** confirmou esta atribuição.



**Figura 48:** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  PA.



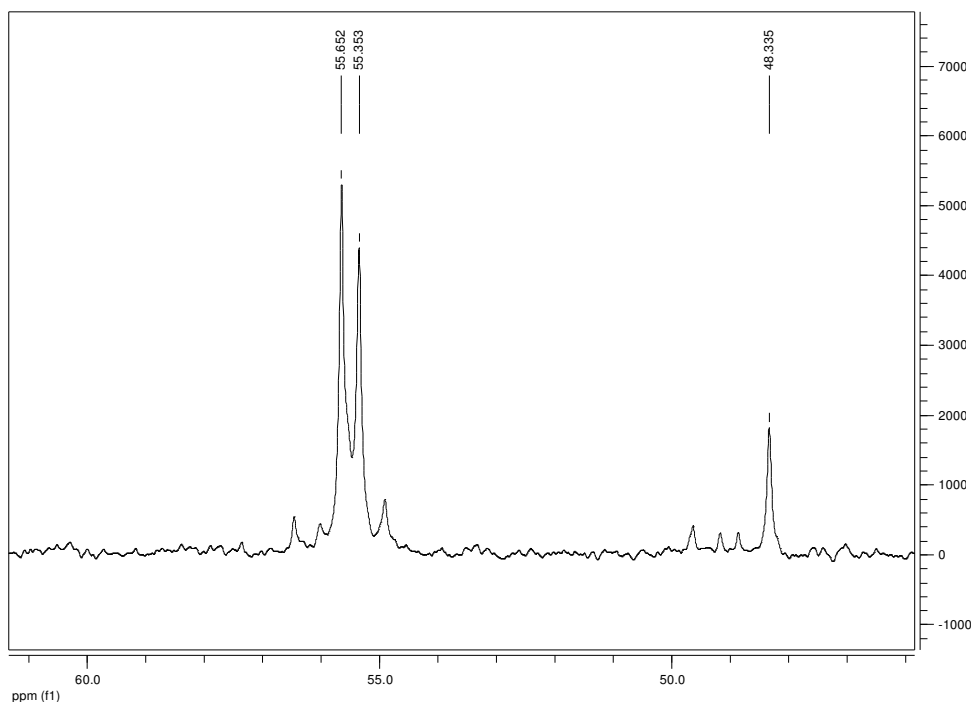


Figura 49: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de PB.

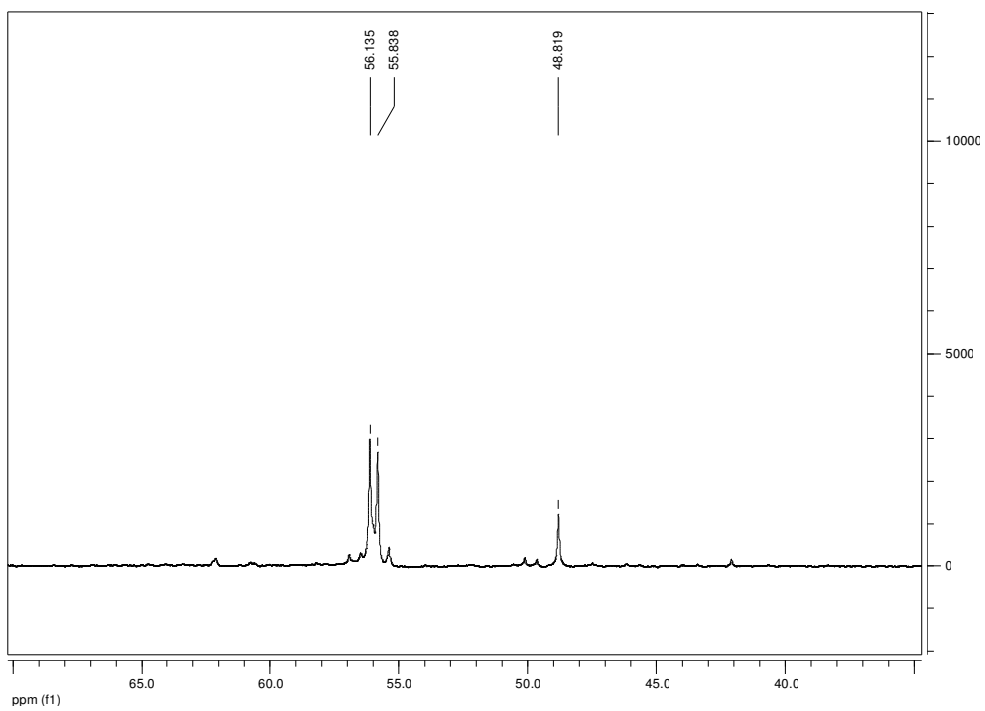


Figura 50: DEPT de PB.

#### IV-2.b-Obtenção de tris(2-tioureidoetil)-(P1) e tris(2-(1-metil-2-tioureidoetil)aminas (P2)<sup>139</sup>

Na reação para a formação de P1 foi utilizado PA e tioureia, em etanol a refluxo por 70 h, obtendo-se rendimento de 55%; com uso de isopropanol, o tempo de refluxo foi de 53 h e com 92% de rendimento. Quando se reagiu PA com 1-metil-2-tioureia, obteve-se P2 com 55% de produto formado pela reação por 48 h em etanol e com 49% de rendimento, em isopropanol por 53 h. Cabe ressaltar que as reações foram repetidas usando-se como solvente isopropanol (*i*-PrOH) e observou-se a obtenção de produtos idênticos tanto para P1 como para P2 (com igual PF e dados espectroscópicos) com a redução do tempo reacional, no entanto, nem sempre com rendimentos superiores.

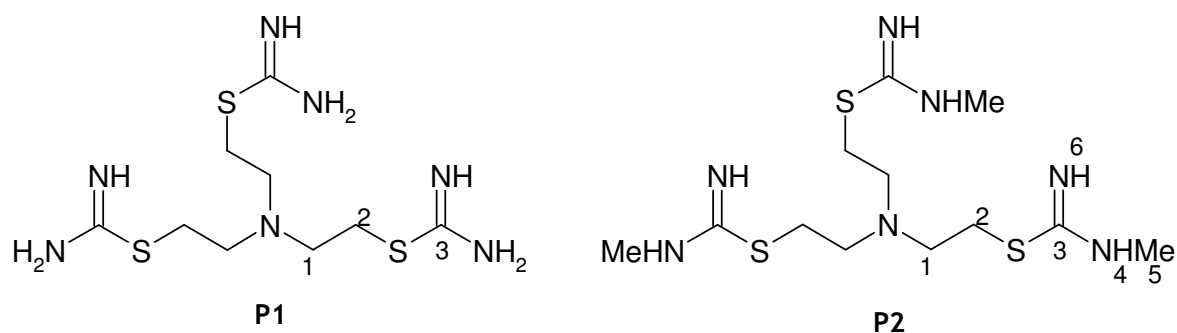


Figura 51: Tris(2-tioureidoetil)amina (P1) e tris(2-(1-metil-2-tioureidoetil)amina (P2).

A caracterização espectrométrica dos compostos P1 e P2 (Figura 51) foi feita através dos espectro no IV, onde se observaram todas as bandas de absorção características do composto sintetizado, confirmando a obtenção dos compostos. Os espectros de IV de P1 (Figura 52) e P2 (Figura 53) confirmaram a sua obtenção pela presença das respectivas bandas de grupos funcionais característicos:

**P1:** 3254 cm<sup>-1</sup>: Def. axial N-H de NH<sub>2</sub>; 3118 cm<sup>-1</sup>: Def. axial (não-simétrica) N-H protonado; 2986 cm<sup>-1</sup>: Def. axial (simétrica) N-H protonado; 2741, 2454, 2341 cm<sup>-1</sup>: Def. axial de C-H<sub>2</sub>; 1647 cm<sup>-1</sup>: Def. axial C=N; 1632 cm<sup>-1</sup>: Def. angular simétrica no plano (N-H).

**P2:** 3431 cm<sup>-1</sup>: Def. axial N-H (não-simétrica) de NH<sub>2</sub>; 3078 cm<sup>-1</sup>: Def. axial N-H (não-simétrica) de NH<sub>2</sub>; 2971 cm<sup>-1</sup>: Def. axial (não-simétrica) N-H protonado; 2928 cm<sup>-1</sup>: Def. axial (simétrica) N-H protonado; 2796, 2649, 2565 cm<sup>-1</sup>: Def. axial de C-H; 1610 cm<sup>-1</sup>: Def. angular simétrica no plano (N-H); 1646 cm<sup>-1</sup>: Def. axial C=N; 1441 cm<sup>-1</sup>: Def. angular CH<sub>3</sub>.

<sup>139</sup> Furukawa, N.; Ogawa, S.; Kawai, T.; Oae, S. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **1984**, 1839.

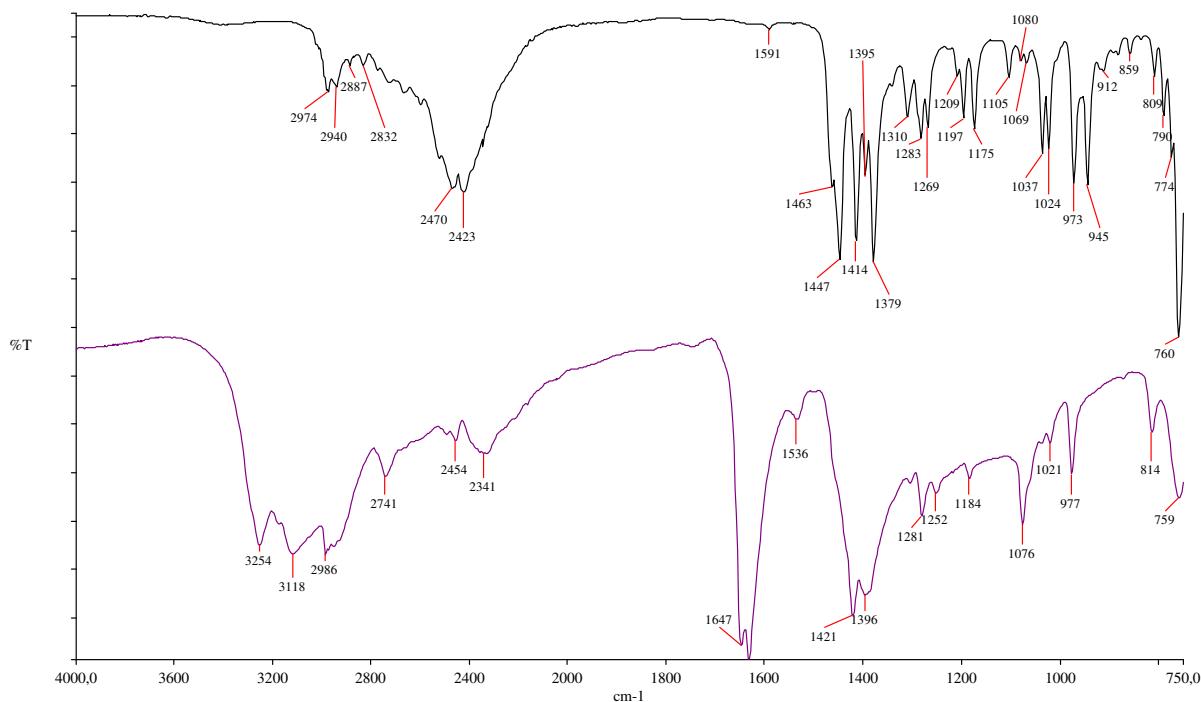


Figura 52: Espectros na região do IV de PA (acima) e de P1 (abaixo).

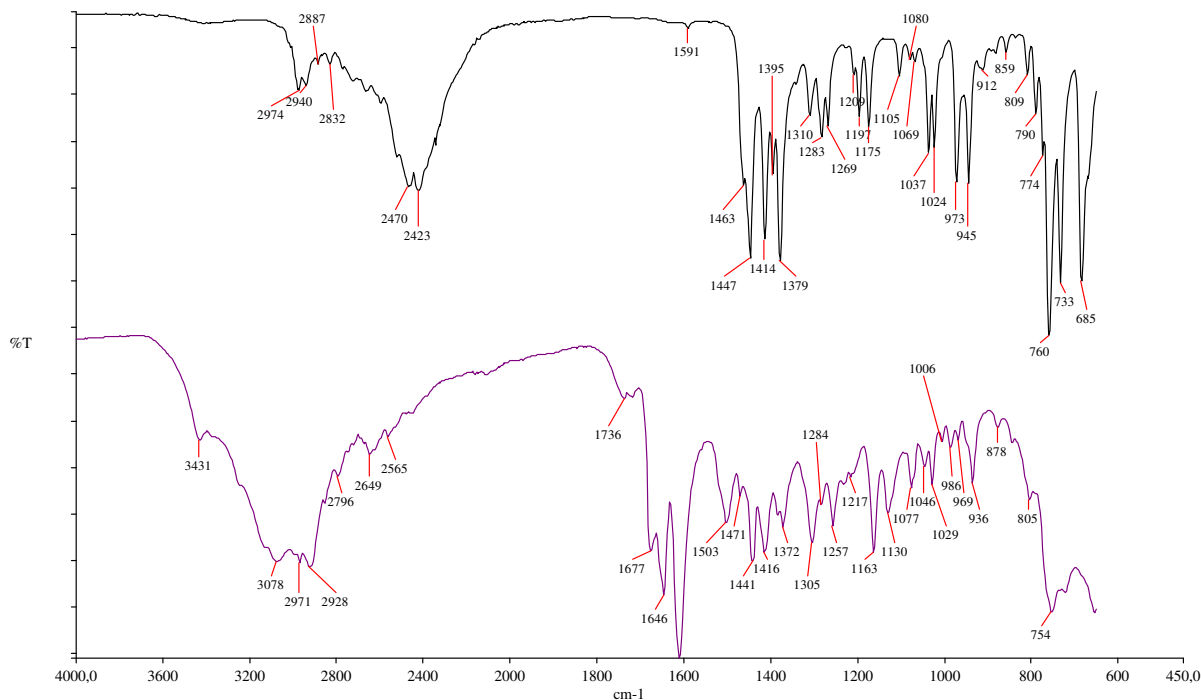
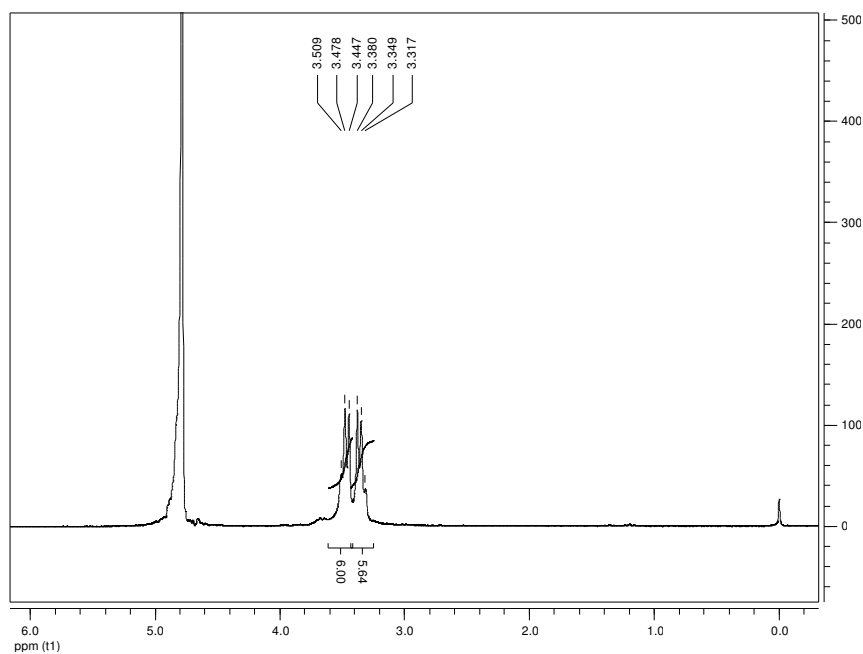


Figura 53: Espectros na região do IV de PA (acima) e de P2 (abaixo).

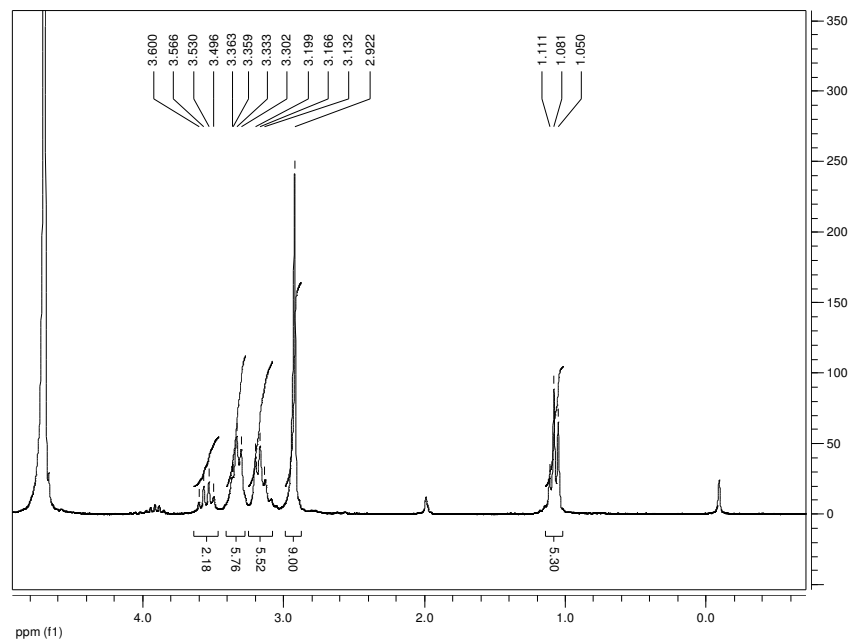
A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  também confirmou a obtenção dos produtos esperados, pois possibilitou a identificação dos diferentes tipos de hidrogênios presentes nas moléculas de P1 (Figura 54) e de P2 (Figura 55):

**P1:** Tripleto, relativo aos hidrogênios vizinhos aos átomos vizinhos ao grupo tioureido (H2) em  $\delta$  3,35 ppm ( $J^{1,2} = 6$ ); tripleto, hidrogênios vizinhos ao átomo de nitrogênio central (H1) em  $\delta$  3,48 ppm ( $J^{2,1} = 6$ )

**P2:** Tripleto, relativo aos hidrogênios vizinhos aos átomos vizinhos ao grupo tioureido (H-2) em 3,17 ppm ( $J^{1,2} = 7$ ); tripleto, hidrogênios vizinhos ao átomo de nitrogênio central (H-1) 3,33 ppm ( $J^{2,1} = 6,0$ ); Um quarteto em  $\delta$  3,55 ppm ( $J^{4,5} = 7$ ): hidrogênios do grupo N-H tioureido (H-4); Um singlete em  $\delta$  2,92 ppm relativo aos hidrogênios de CH<sub>3</sub> do grupo NHCH<sub>3</sub> (H-5).



**Figura 54:** Espectros de RMN <sup>1</sup>H de P1.

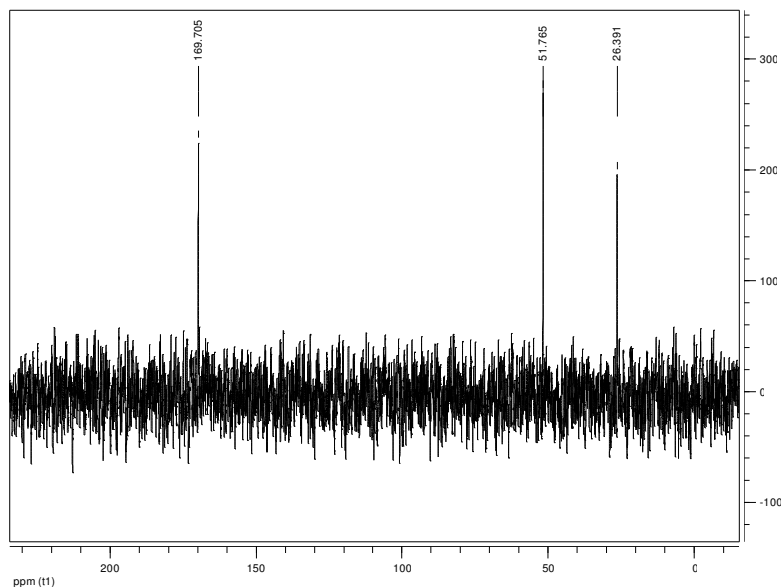


**Figura 55:** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  de P2.

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi possível atribuir os sinais correspondentes aos carbonos esperados nas moléculas de P1 (Figura 56) e de P2 (Figura 57), respectivamente:

**P1:**  $\delta$  26,39 ppm: relativo ao carbono vizinho ao átomo de enxofre (C-2);  $\delta$  51,76 ppm: relativo ao carbono vizinho ao nitrogênio central (C-1);  $\delta$  169,70 ppm: relativo ao carbono  $\text{sp}^2$  tipo amidínicos (C-3).

**P2:**  $\delta$  26,34 ppm: relativo ao carbono vizinho ao átomo de enxofre (C-2);  $\delta$  30,36 ppm: referente ao grupo metil-tioureido (C-5);  $\delta$  52,19 ppm: relativo ao carbono vizinho ao nitrogênio central (C-1);  $\delta$  165,80 ppm: relativo ao carbono  $\text{sp}^2$  tipo amidínico (C-3).



**Figura 56:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de P1.

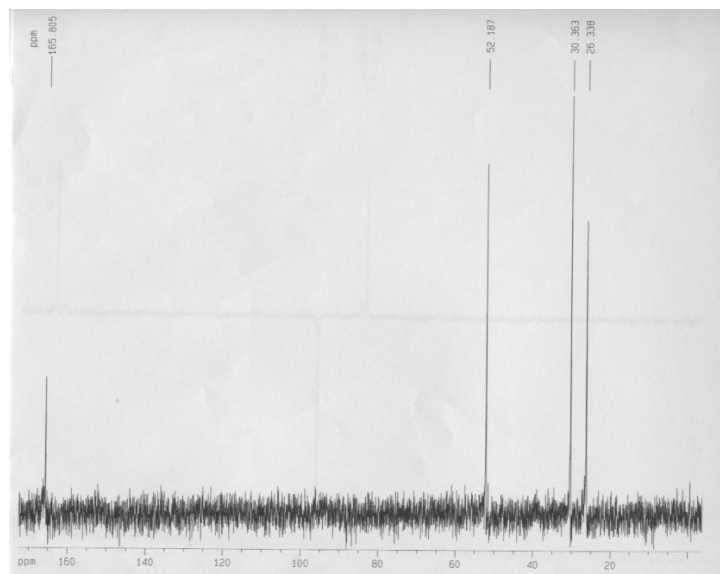


Figura 57: Espectro de RMN de <sup>13</sup>C P2.

Os sub-espectros DEPT de P1 (Figura 58) e de P2 (Figura 59) indicaram as fases dos átomos de carbono sp<sup>3</sup> das estruturas planejadas:

**P1:** δ 26,90 ppm: sinal relativo ao carbono vizinho ao átomo de enxofre (C2); δ 52,26 ppm: carbono vizinho ao nitrogênio central (C1).

**P2:** δ 27,03 ppm: sinal relativo ao carbono vizinho ao átomo de enxofre (C2); 52,47 ppm: carbono vizinho ao nitrogênio central (C1), δ 30,68 ppm: o sinal referente ao grupo metila-tioureido (C4).

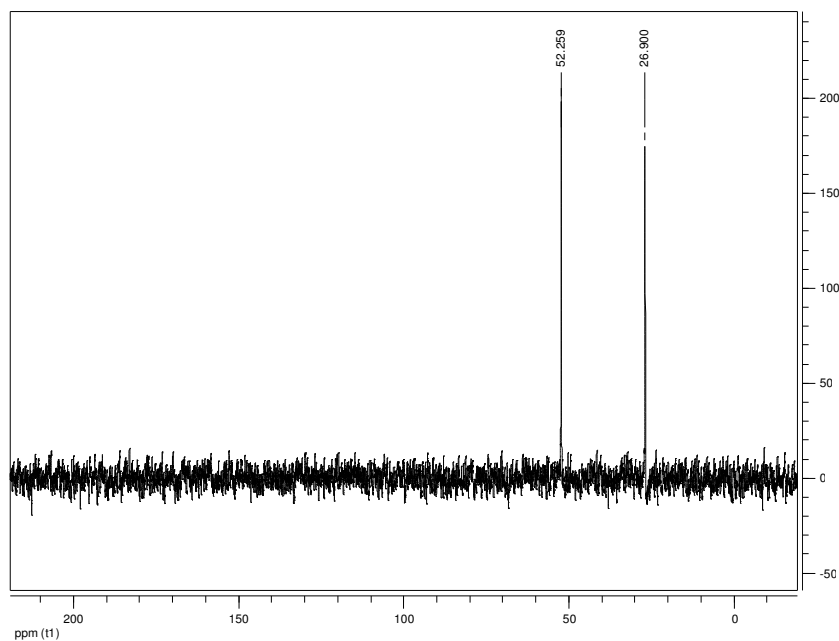


Figura 58: Espectros de DEPT de P1.

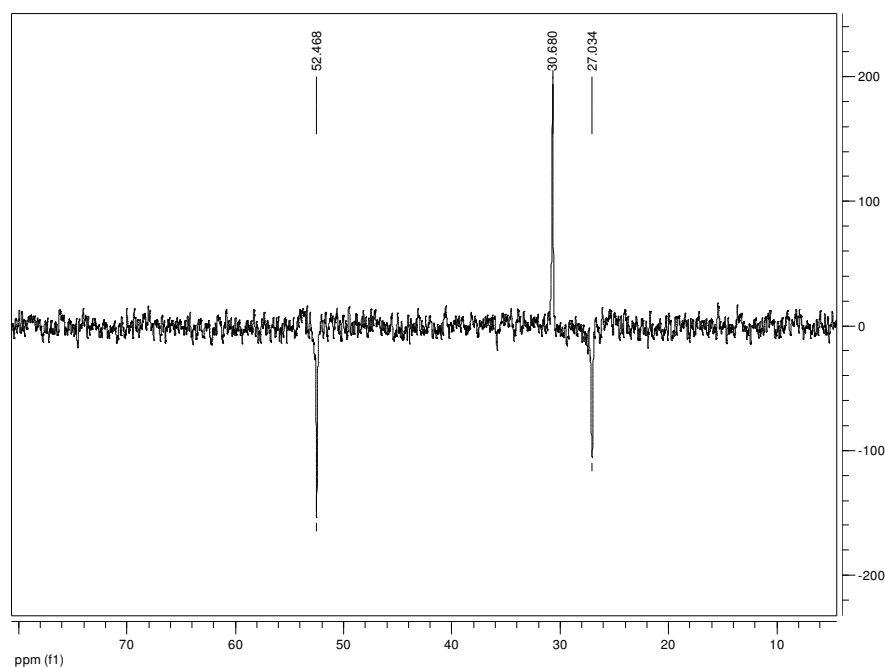


Figura 59: Espectros de DEPT de P2.

#### IV-2.c-Obtenção de tris(2-(1,3-dimetil)-tioureidoetil)amina (P3) e N,N,N',N'-tetrakis(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)etileno-diamina (P6).

Os procedimentos para a obtenção dos compostos P3 e P6 (Figura 60) foram análogos aos relatados para a preparação de P1 e P2, no entanto, utilizou-se como solvente apenas isopropanol, com adição de iodeto de potássio para catalisar a reação de substituição nucleofílica, o tempo de reação para P3 foi de 43h, com rendimento de 83%. No caso de P7, o rendimento foi de 80% após 46h de reação.

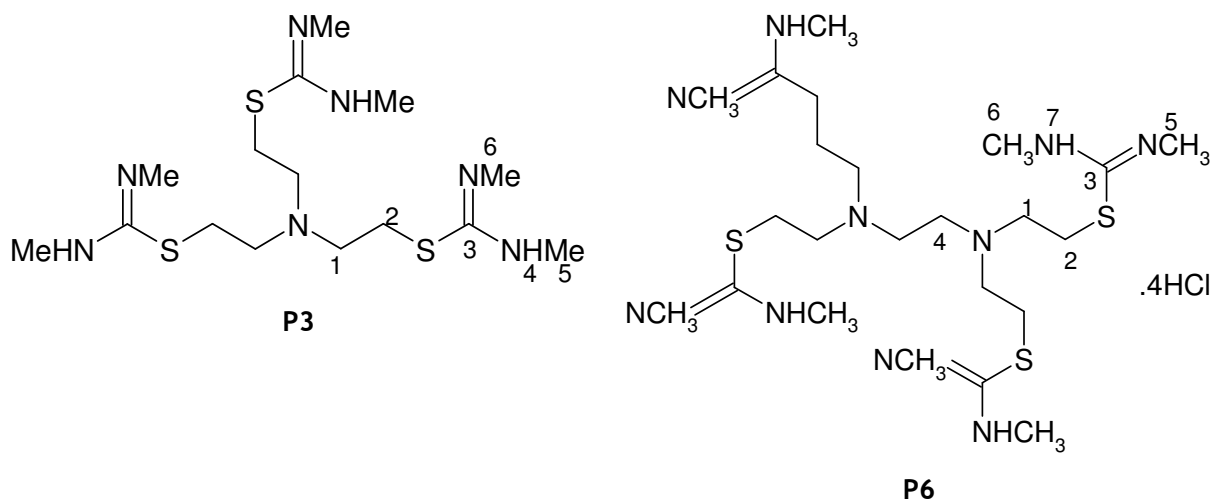
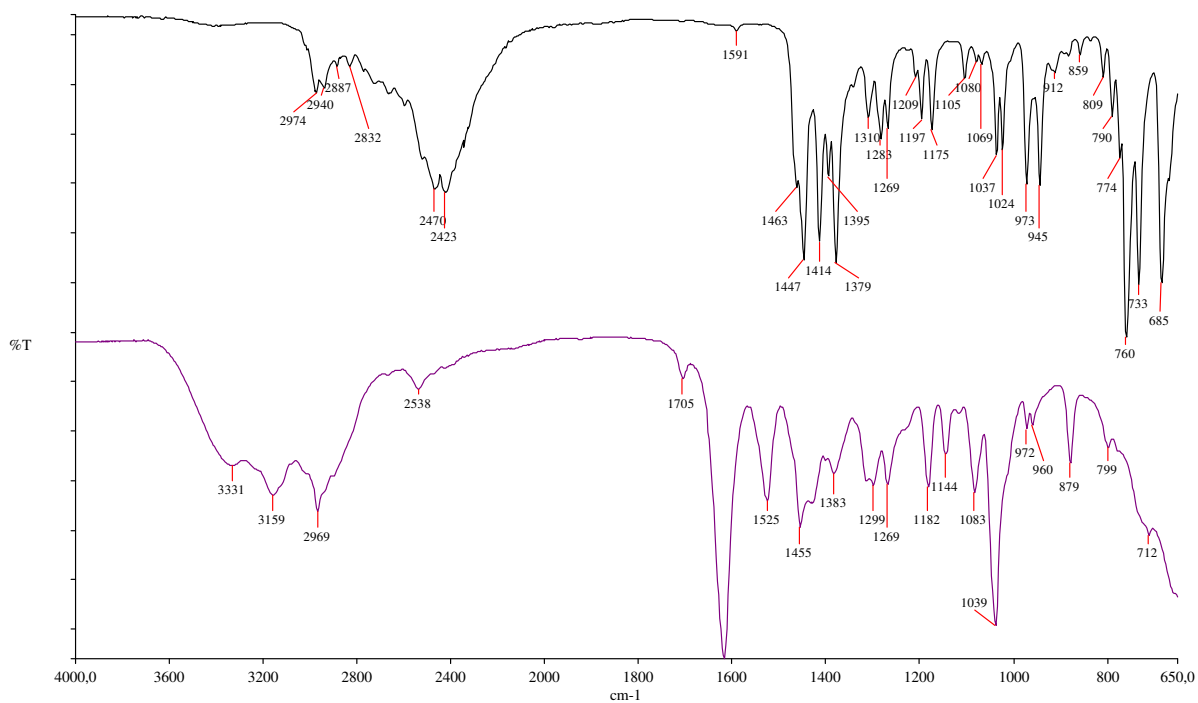


Figura 60: Tris(2-(1,3-dimetil)-tioureidoetil)amina (P3) e N,N,N',N'-tetrakis(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)etileno-diamina (P6).

Pela análise dos espectros de IV de **P3** (Figura 61) e **P6** (Figura 62), constatou-se as bandas caracterísctas esperadas, respectivamente:

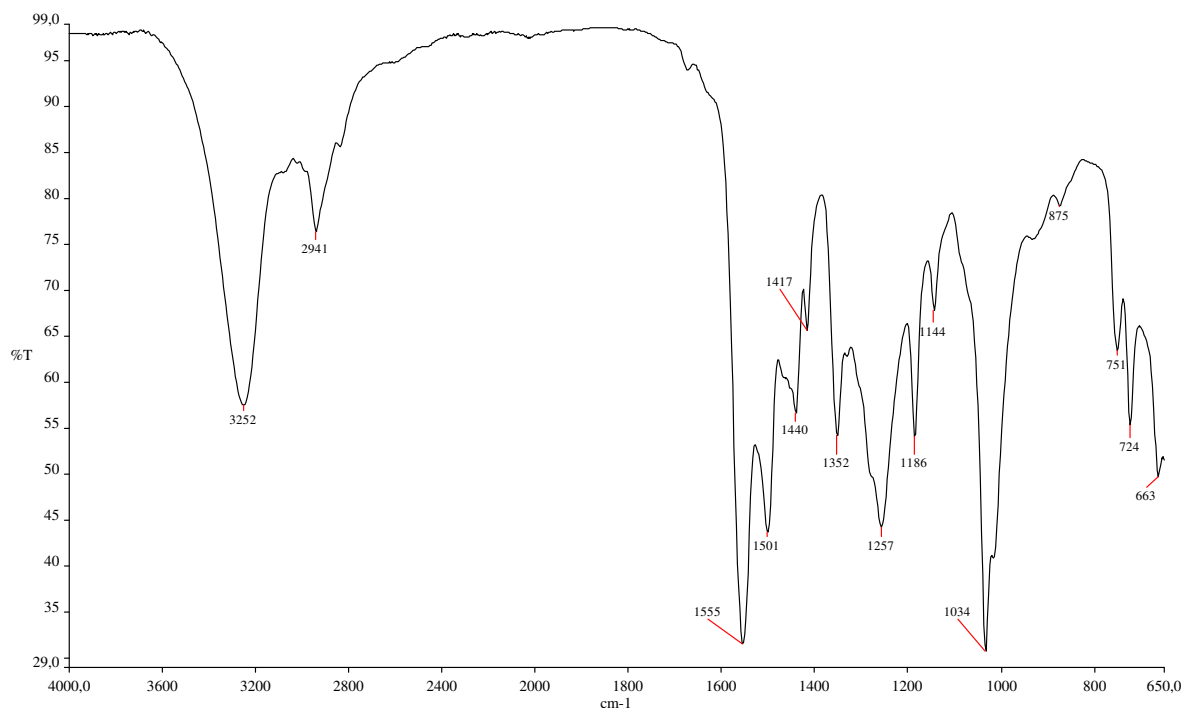
**P3:** 3159  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial (não-simétrica) N-H protonado; 2969  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial (simétrica) N-H protonado; 1617  $\text{cm}^{-1}$ : Def. angular (simétrica)no plano de N-H; 1705  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C=N; 1525,1455  $\text{cm}^{-1}$ : Def. angular CH<sub>3</sub>; 712  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C-S.

**P6:** 3252  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial N-H protonado; 2941  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial (simétrica) CH<sub>2</sub>; 1555  $\text{cm}^{-1}$ : Def. angular sim. no plano de NH; 1501  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C=N; 1440  $\text{cm}^{-1}$ : Def. angular CH<sub>3</sub>; 663  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C-S.



**Figura 61:** Espectro na região do IV de **PA** (acima) e **P3** (abaixo).





**Figura 62:** Espectro na região do IV de **P6**.

As estruturas propostas para os produtos obtidos **P3** e **P6** foram confirmadas também a partir da análise do RMN de  $^1\text{H}$ , para ambos os experimentos o solvente utilizado foi  $\text{D}_2\text{O}$ .

Assim para o derivado trissubstituído **P3** há: um singlete em  $\delta$  2,89 ppm: grupos metila-tioureido ligados a nitrogênio  $\text{sp}^3$  (H-5); um singlete em  $\delta$  2,98 ppm: grupos metila-tioureido ligados a nitrogênio  $\text{sp}^2$  (H-6); um tripleto em  $\delta$  3,27 ppm ( $J^{2,1} = 6$  Hz): relativo aos hidrogênios vizinhos ao átomo enxofre (H-2); um tripleto em  $\delta$  3,39 ppm ( $J^{1,2} = 6$  Hz): relativo aos hidrogênios vizinhos ao átomo de nitrogênio central;  $\delta$  3,52 ppm ( $J^{4,5} = 7$  Hz): relativo aos hidrogênios vizinhos ao grupo metila (H-4).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado tetra-funcionalizado **P6** por sua vez mostra sinais análogos: um sinal alargado em  $\delta$  2,82 ppm referente simultaneamente aos dois tipos de metilas ligados aos nitrogênios  $\text{sp}^3$  e  $\text{sp}^2$  (H-5 e H-7); um tripleto em  $\delta$  3,09 ppm ( $J^{1,2} = 5$  Hz) referente a C-2; um tripleto em  $\delta$  3,25 ppm ( $J^{2,1} = 5$  Hz) referente a C-1 e um sinal singlete  $\delta$  3,77 ppm referente aos hidrogênios do grupo etilendiamina (C-4).

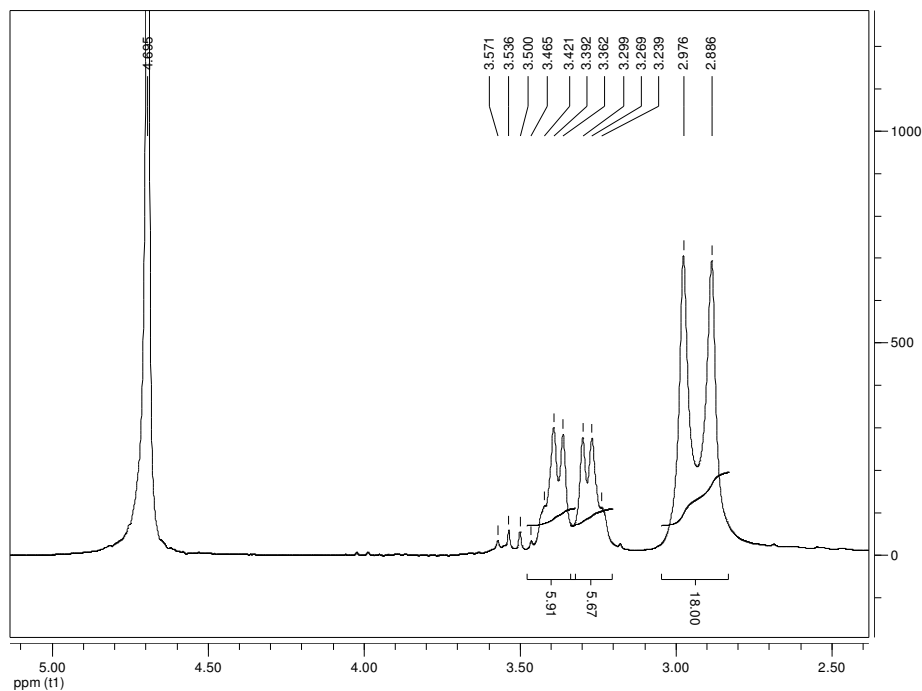


Figura 63: Espectro de RMN de 1H de P3 (D<sub>2</sub>O).

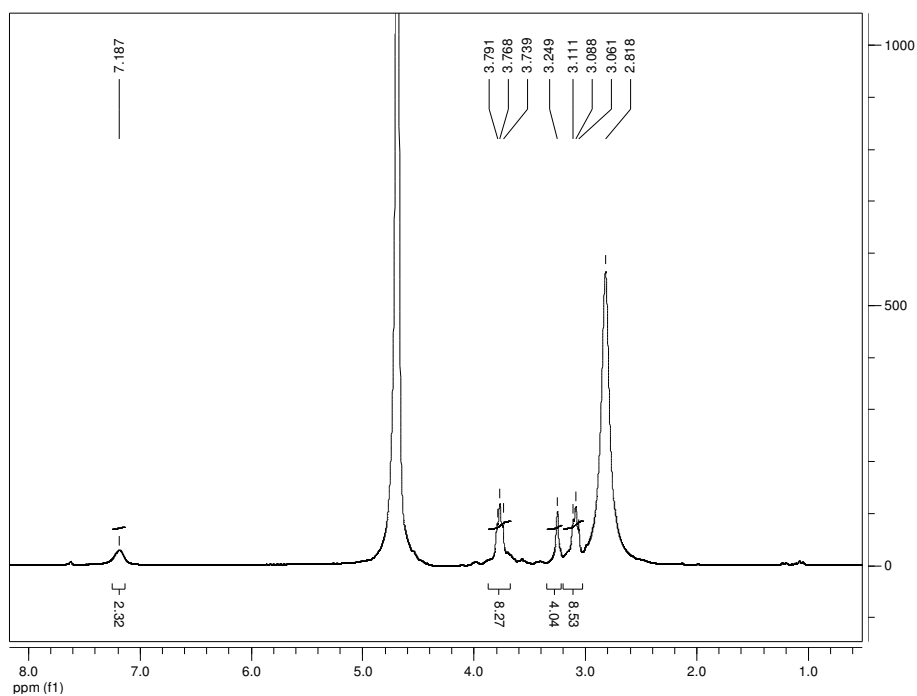


Figura 64: Espectro de RMN de 1H de P6 (D<sub>2</sub>O).

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C mostra o número de tipo de carbonos também condizente ao esperado nas estruturas propostas para P3 e P6 com sinais em:

**P3:** δ 27,28 ppm para os carbonos vizinhos ao átomo de enxofre (C-2); δ 30,02 ppm dos carbonos de grupo metílicos em nitrogênio sp<sup>3</sup>(C-5); δ 30,75 ppm, metilas de nitrogênio em sp<sup>2</sup>(C-6); δ

51,37 ppm referentes ao carbono vizinho ao nitrogênio central (C-1);  $\delta$  166,93 ppm referentes aos carbonos imidínicos (C-3).

**P6:**  $\delta$  166,04 ppm dos carbonos imínicos (C-3);  $\delta$  56,38 ppm sinal referente ao carbono vizinho ao nitrogênio da cadeia lateral (C-1);  $\delta$  51,24 ppm sinal referente ao carbono etilenodiamínico (C-4);  $\delta$  31,38 ppm sinal correspondente ao carbono vizinho ao átomo de enxofre (C-2);  $\delta$  18,93 ppm sinal referente ao carbono de grupo metílico em nitrogênio  $sp^3$  (C-6).

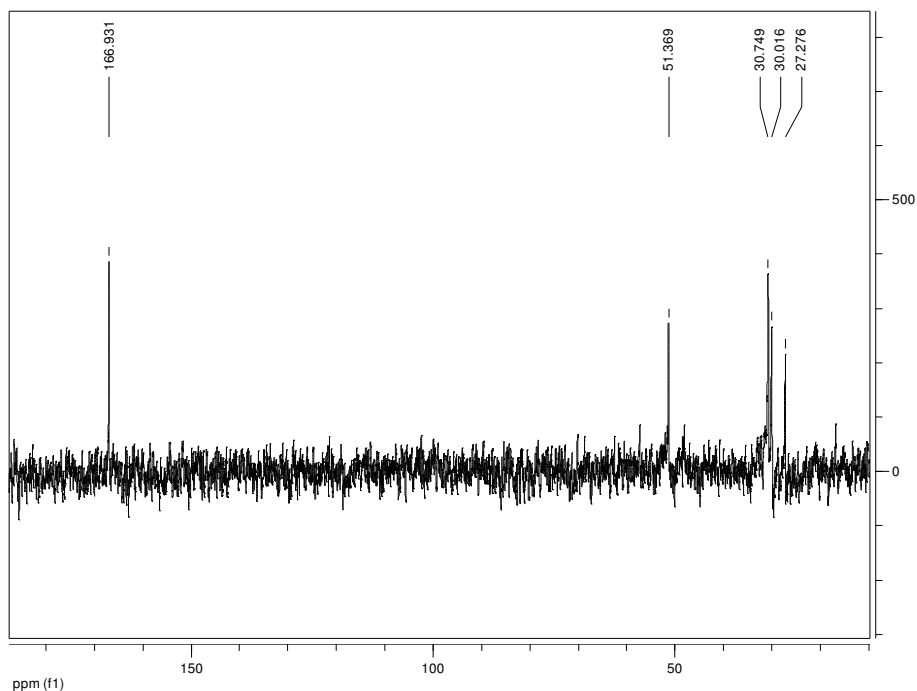


Figura 65: Espectro de RMN  $^{13}C$  de P3 ( $D_2O$ ).

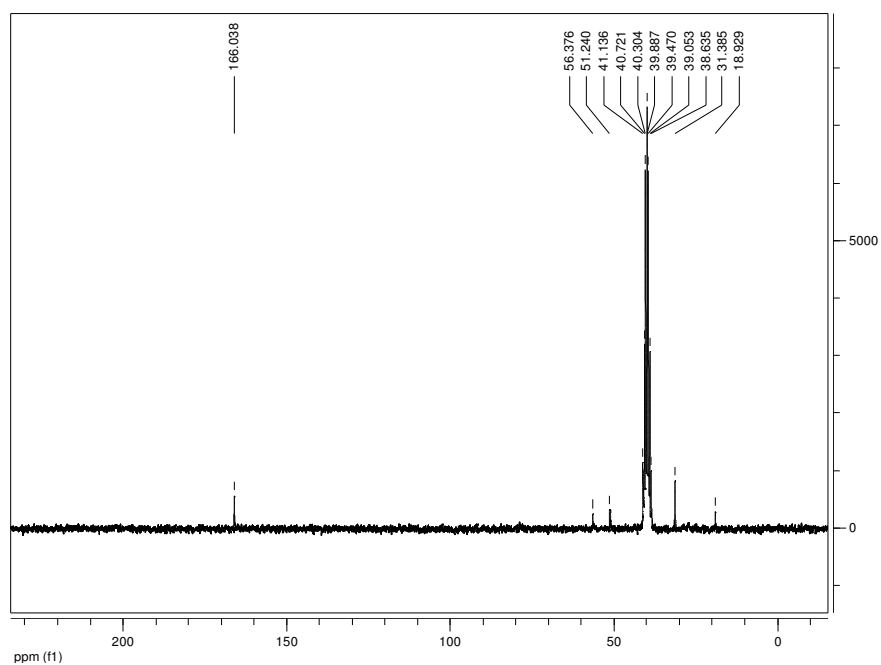


Figura 66: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de P6 (DMSO).

Os sub-espectros DEPT (Figuras 67 e 68) colaboraram na caracterização dos sinais através da diferenciação entre os carbonos metilênicos e metílicos, além de revelar o sinal referente ao grupo metila de C-5 para P6.

**P3:**  $\delta$  27,74 ppm para os carbonos vizinhos ao átomo de enxofre (C-2);  $\delta$  30,47 ppm dos carbonos de grupo metílicos em nitrogênio  $\text{sp}^3$ (C-5);  $\delta$  31,22 ppm, metilas de nitrogênio em  $\text{sp}^2$ (C-6);  $\delta$  51,85 ppm referentes ao carbono vizinho ao nitrogênio central (C-1).

**P6:**  $\delta$  56,86 ppm sinal referente ao carbono vizinho ao nitrogênio da cadeia lateral (C-1);  $\delta$  51,73 ppm sinal referente ao carbono etilenodiamínico (C-4);  $\delta$  31,87 ppm sinal referente ao carbono de grupo metílico em nitrogênio  $\text{sp}^2$  (C-5);  $\delta$  27,77 ppm sinal correspondente ao carbono vizinho ao átomo de enxofre (C-2);  $\delta$  19,41 ppm sinal referente ao carbono de grupo metílicos em nitrogênio  $\text{sp}^3$ (C-6).

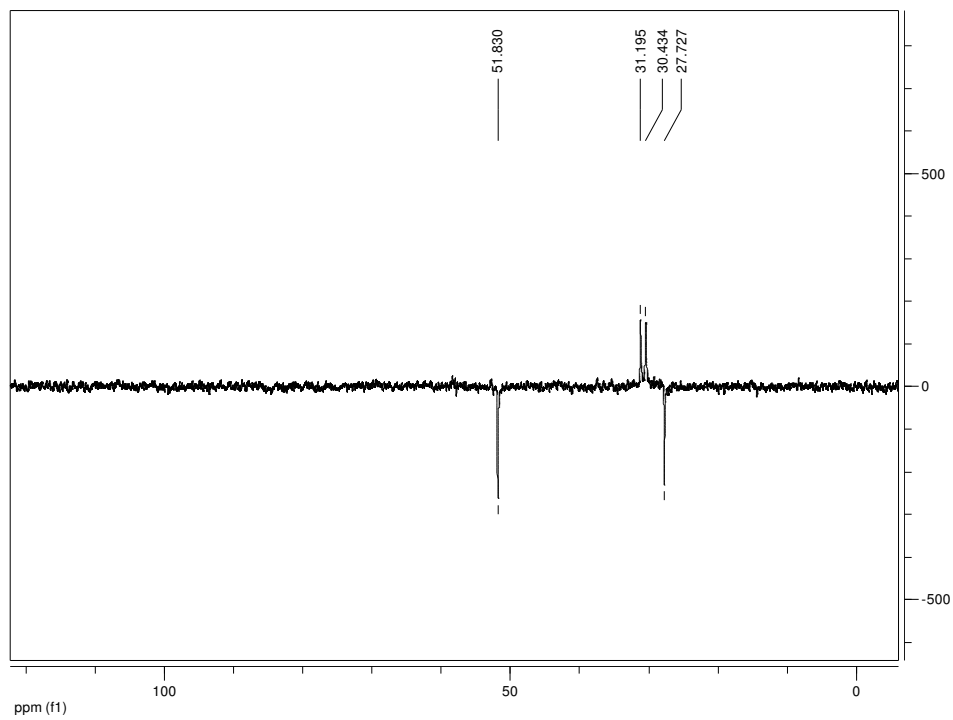


Figura 67: DEPT de P3.

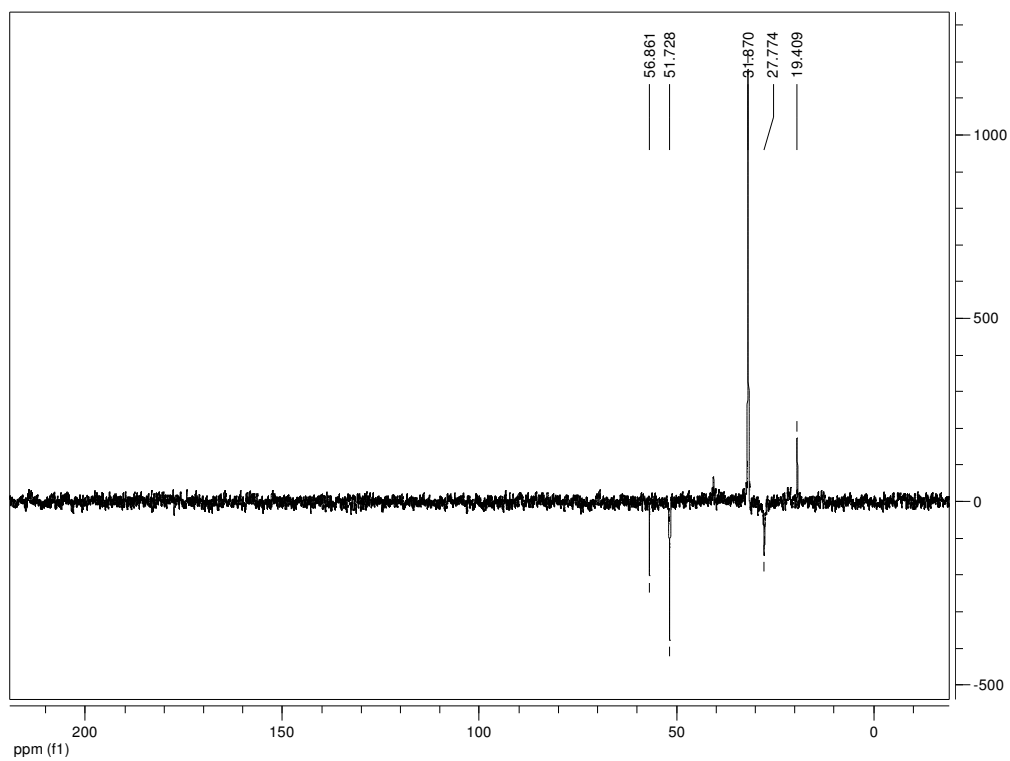
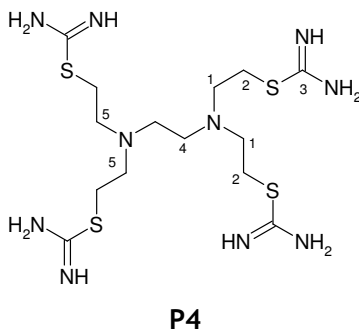


Figura 68: DEPT de P6 (DMSO).

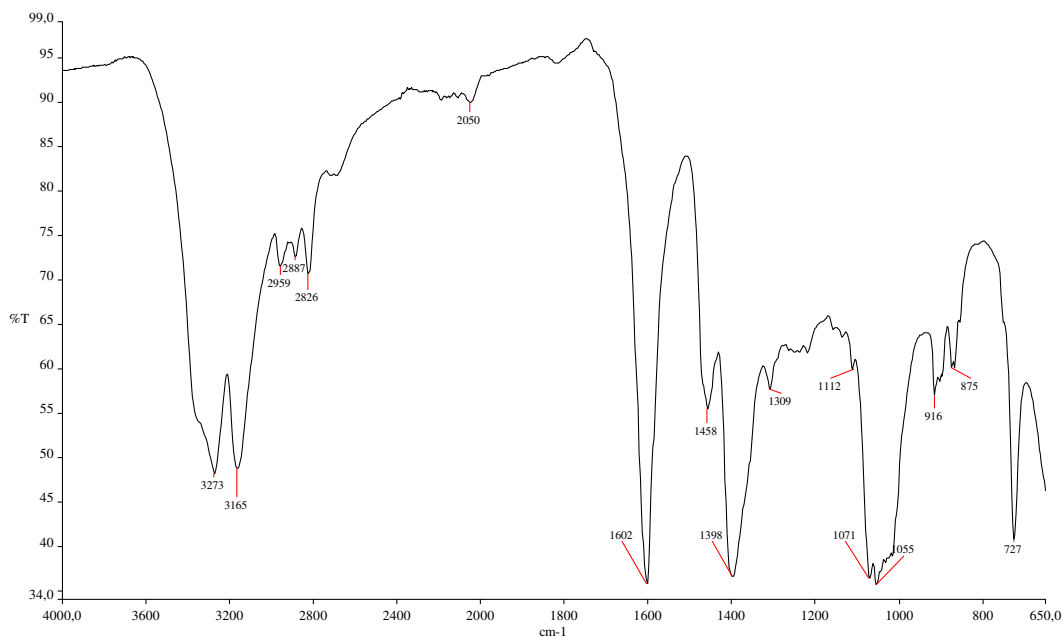
#### IV-2.d- Obtenção de N,N,N', N' - tetrakis (2-tioureidoetil)etilenodiamina (P4).

O método de preparação para **P4** (Figura 69) é análogo ao dos compostos tioureido-substituídos mencionados anteriormente. A partir do haleto de alquila correspondente **PB** que foi submetido a refluxo juntamente com tioureia e isopropanol na presença de iodeto de potássio ou carbonato de sódio, os rendimentos foram, respectivamente, em torno de 50% a 60%.



**Figura 69:** N,N,N', N' - tetrakis (2-tioureidoetil)etilenodiamina (**P4**).

A obtenção do derivado tioureido desejado **P4** foi verificada e comprovada por análise espectrométrica, pois a análise por espectrometria na região do infravermelho (Figura 70), mostrou as bandas de absorção características do composto sintetizado, tais como: 3273  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial (não-simétrica) N-H; 3165  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial (simétrica) N-H; 2959, 2887, 2826  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial de C-H de  $\text{CH}_2$ ; 1602  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C=N ; 1398  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial NC-H; 1071  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C-N e 727  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C-S.



**Figura 70:** Espectro na região do IV de **P4**.

Além disso, a estrutura molecular de P4 foi confirmada devido à presença dos hidrogênios característicos da estrutura proposta (Figura 71): um tripleto em  $\delta$  3,50 ppm ( $J^{2,1} = 5$  Hz) que indica os hidrogênios vizinhos a enxofre da cadeia lateral (H-2); singlete em  $\delta$  3,86 ppm hidrogênios dos grupos CH<sub>2</sub> centrais da molécula (H-4); um tripleto em  $\delta$  3,98 ppm ( $J^{1,2} = 5$  Hz) relativo aos hidrogênios vizinhos ao átomo de nitrogênio da cadeia lateral (H-1).

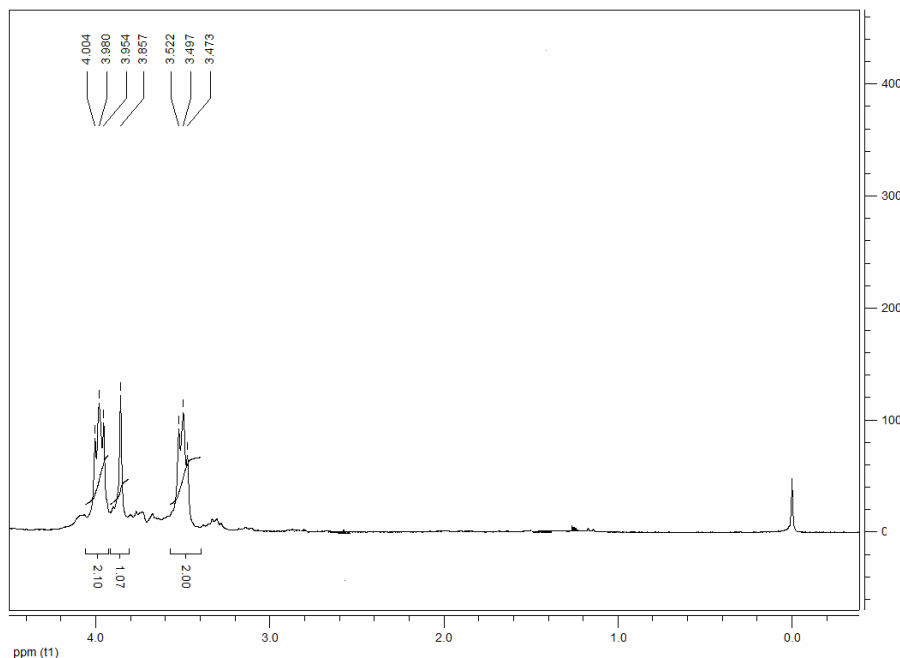


Figura 71: RMN <sup>1</sup>H de P4 em D<sub>2</sub>O.

O RMN de <sup>13</sup>C (Figura 72) também confirmou a presença dos carbonos esperados nas moléculas de P4:  $\delta$  50,82 ppm: referentes aos átomos vizinhos ao enxofre de tioureido (C-2);  $\delta$  55,22 ppm: relativos aos átomos de carbono centrais (C-4);  $\delta$  58,40 ppm referente aos carbonos vizinhos a nitrogênio da cadeia lateral (C-1) e  $\delta$  181,70 ppm: referentes aos carbonos sp<sup>2</sup> de grupo amidino (C-3).

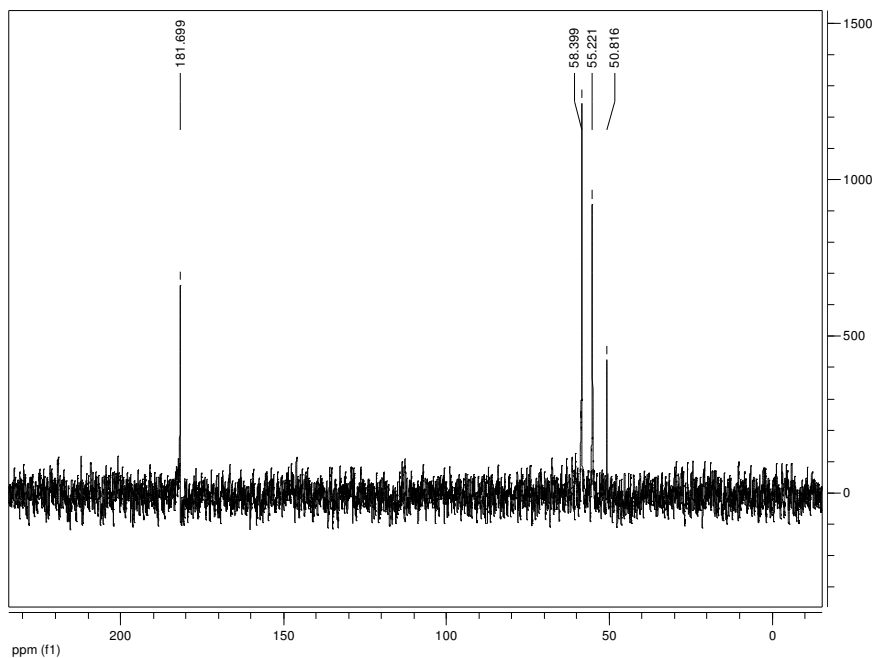


Figura 72: RMN  $^{13}\text{C}$  de P4 em  $\text{D}_2\text{O}$ .

A análise do sub-espectro DEPT (Figura 73) contribuiu para a caracterização do composto P4:  $\delta$  48,40 ppm: referentes aos átomos vizinhos ao enxofre de tioureido (C-2);  $\delta$  55,55 ppm: relativos aos átomos de carbono centrais (C-4);  $\delta$  56,03 ppm referentes a carbonos vizinhos a nitrogênio da cadeia lateral (C-1) .

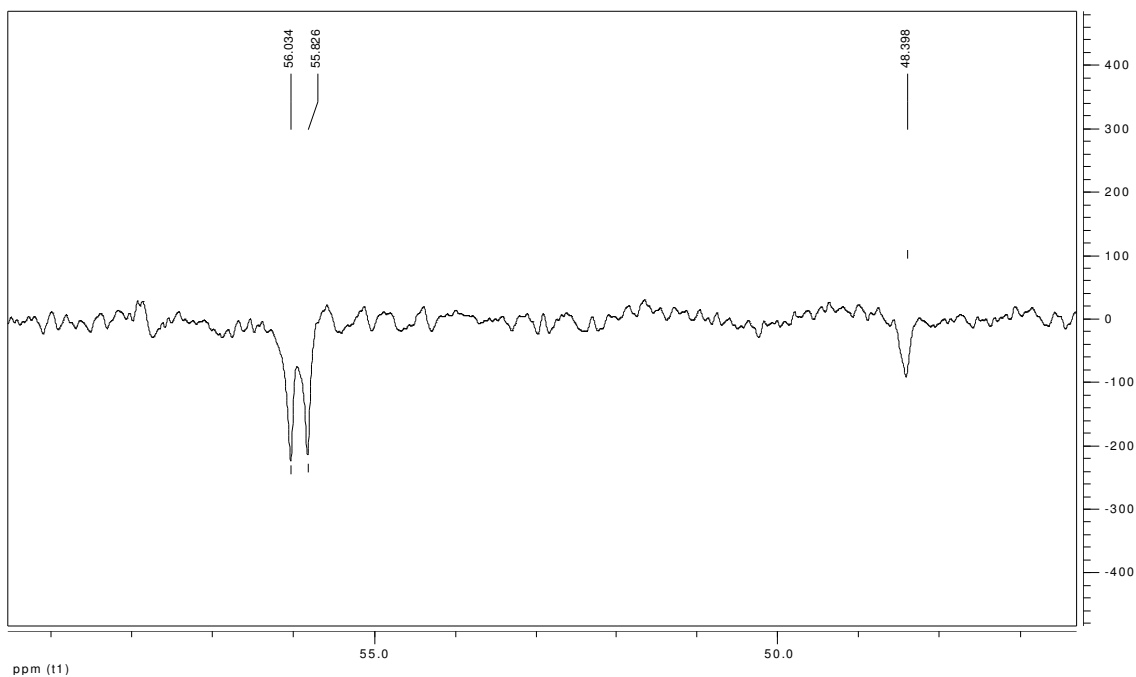


Figura 73: A presença do terceiro átomo de carbono da estrutura molecular de P4 foi confirmada pelo DEPT.



#### IV.2.e-Obtenção de N,N,N',N'-tetrakis(2-metil-tioureido-etil)etilenodiamina (P5)

De maneira similar aos demais tioureidos, P5 (Figura 74) foi preparado a partir de tioureira e sua estrutura molecular foi confirmada pela análise das técnicas espectrocópicas.

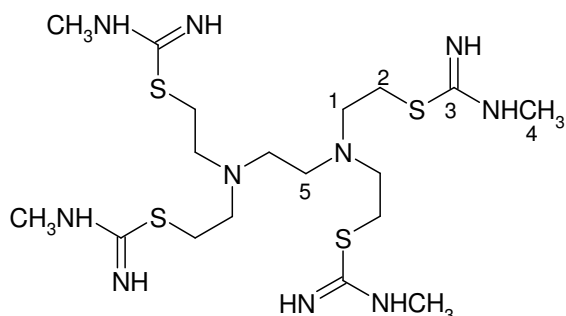


Figura 74: Estrutura de N,N,N',N'-tetrakis(2-metil-tioureido-etil)etilenodiamina (P5).

No infravermelho foram identificadas as seguintes bandas: 3252  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial (não-sim. sim.) de N-H; 2941  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial de C-H; 1555  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C=N (ligada a N); 1555  $\text{cm}^{-1}$ : (que é uma banda nitidamente larga), 1501  $\text{cm}^{-1}$ : Def. angular CH<sub>3</sub>; 1257, 1086  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C-N; 663  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C-S.

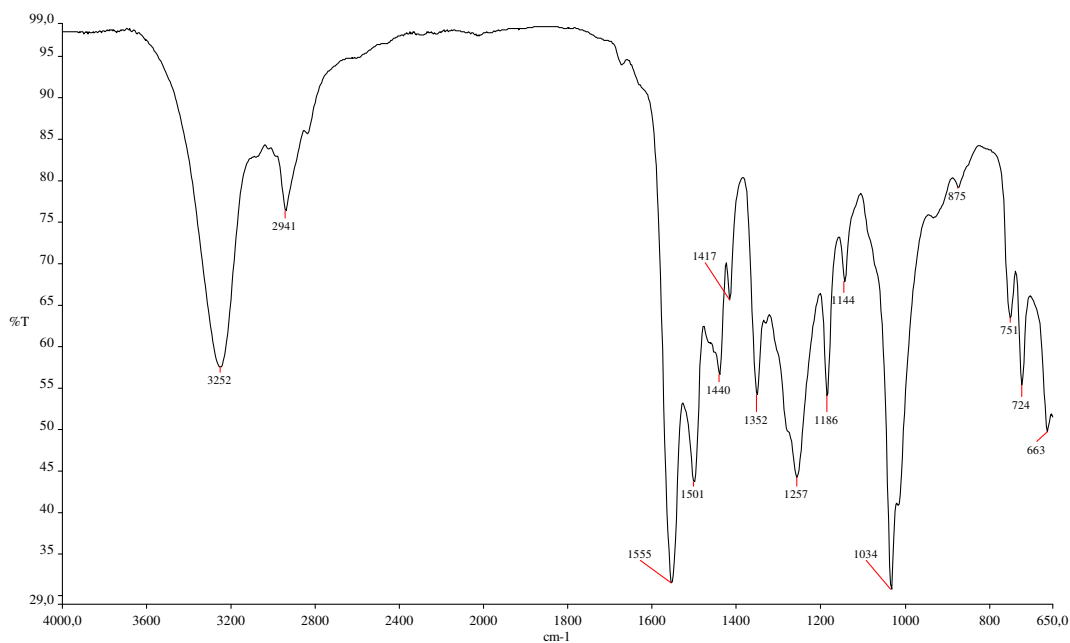
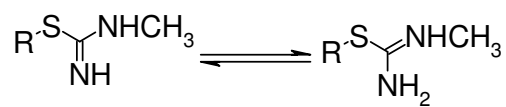


Figura 75: Espectro na região do IV de P5.

No RMN foi possível atribuir os respectivos carbonos presentes na estrutura:  $\delta$  29,45 ppm,  $\delta$  31,20 ppm,  $\delta$  50,05 ppm,  $\delta$  54,74 ppm,  $\delta$  56,93 ppm e  $\delta$  178,16 ppm.

A presença de diferentes grupos metilas neste tipo de composto pode ser explicada pelo seguinte equilíbrio ilustrado na figura 76.



Onde

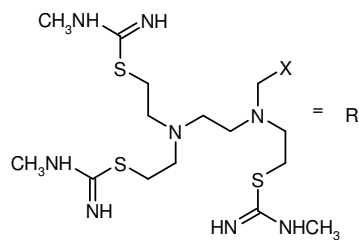


Figura 76: Equilíbrio do grupo terminal metil-tioureido.

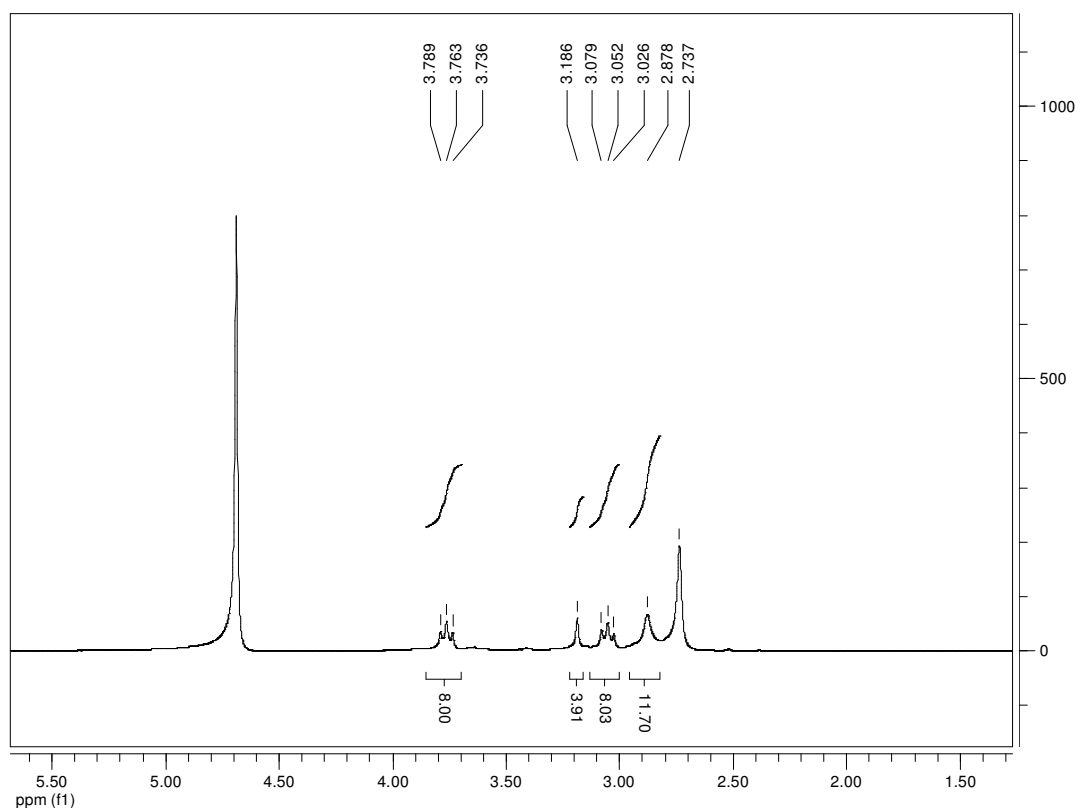


Figura 77: Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de P5.

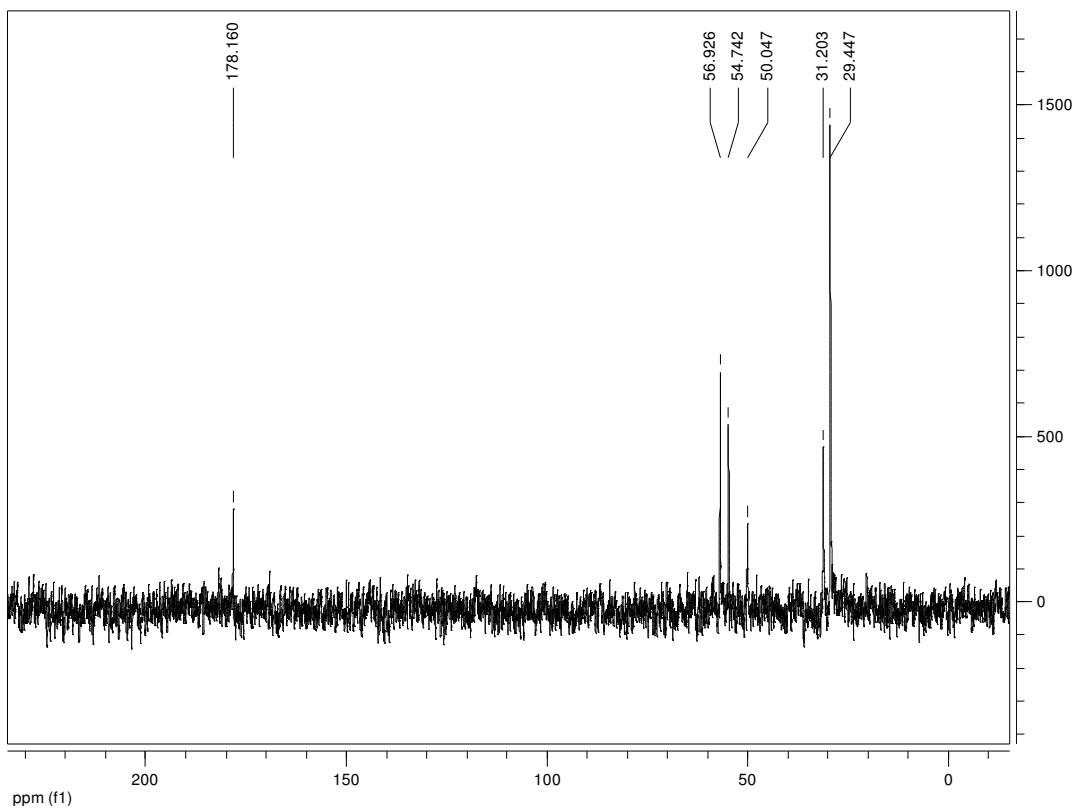


Figura 78: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de P5.

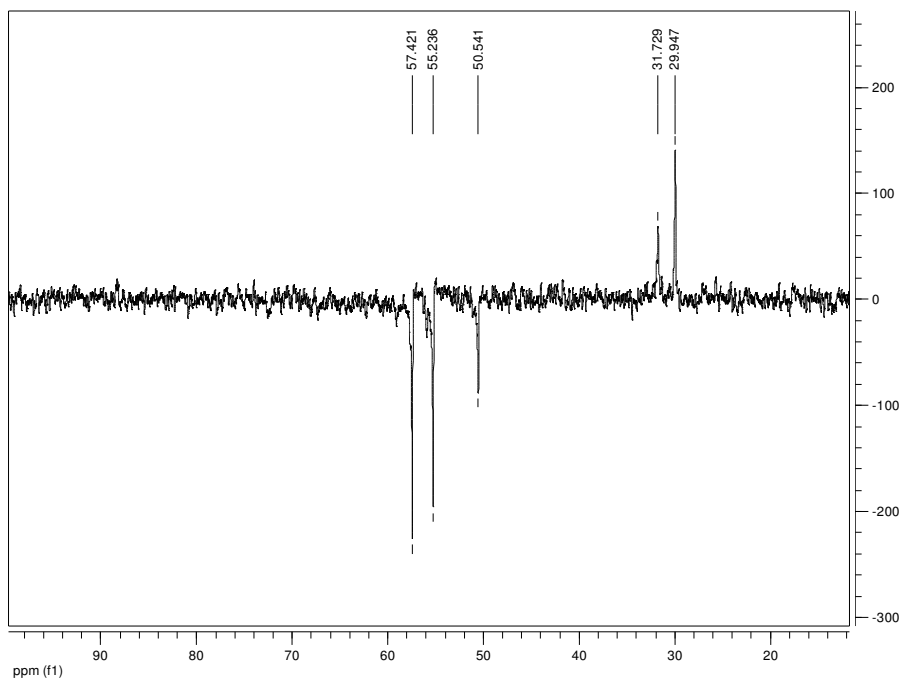
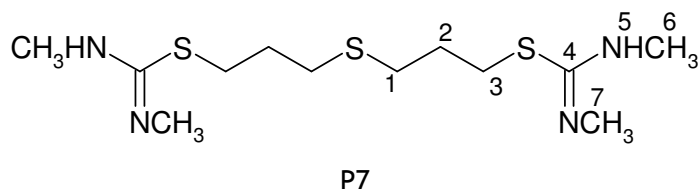


Figura 79: DEPT de P5.

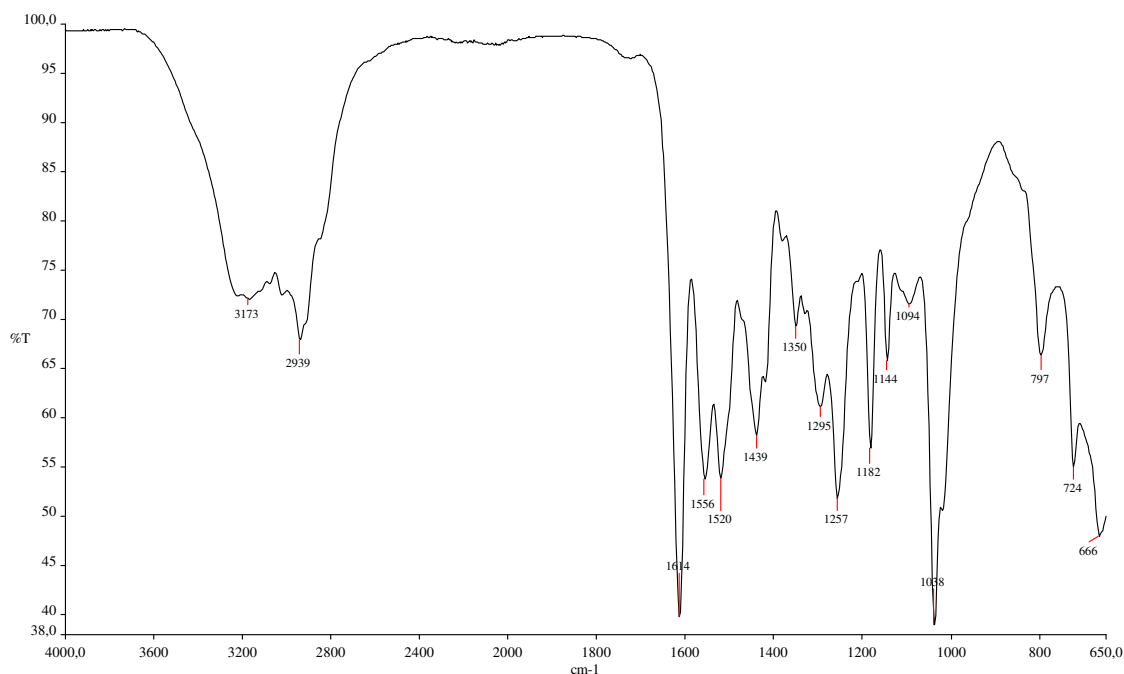
#### IV.2.f- Obtenção de 1,7-bis-(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)-4-tia-heptano (P7)

Para preparação de **P7** utilizou-se 1,3-dimetil-2-tioureia e 1,7-bis(2-cloroetil)-4-tia-heptano (**PE**) na proporção 2:1 (mol/mol) em refluxo por 7,5 h com 57% de rendimento.



**Figura 80:** 1,7-bis-(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)-4-tia-heptano (**P7**).

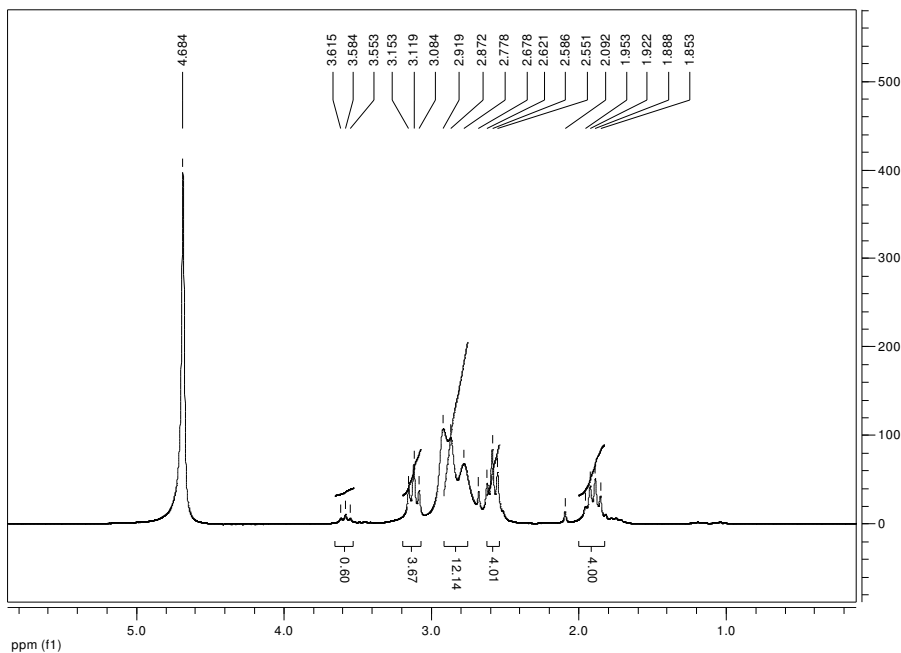
Para elucidação deste composto foi fundamental a utilização de métodos espectrométricos, entre eles, o espectro no IV (Figura 59) indicou a presença das bandas características nesta molécula: 3173, 2939  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial (não-sim. sim.) N-H protonado; 2939  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial de C-H; 1614  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C=N (ligada a N); 1556, 1520  $\text{cm}^{-1}$ : Def. angular CH<sub>3</sub>; 1257, 1038  $\text{cm}^{-1}$ : Def. axial C-N e 666  $\text{cm}^{-1}$ : Def. Axial C-S.



**Figura 81:** Espectro na região do infravermelho de 1,7-bis-(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)-4-tia-heptano (**P7**).

A partir da análise de RMN de <sup>1</sup>H foi possível identificar os diferentes hidrogênios esperados: um quinteto em  $\delta$  1,89 ppm ( $J^{2,1} = J^{2,3} = 7$  Hz) relativo aos hidrogênios de H-2 da

molécula, um triplete em  $\delta$  2,59 ppm ( $J^{1,2} = J^{1,3} = 7$  Hz) relativo aos hidrogênios vizinhos ao átomo de enxofre central (H-1), duplete em  $\delta$  2,90 ppm ( $J^{5,6} = 9$  Hz) relativos a hidrogênios do grupo metila (H-6); um singlete em  $\delta$  2,78 ppm que indica os hidrogênios do grupo metila (H-7), um triplete em  $\delta$  3,12 ppm ( $J^{3,2} = J^{2,3} = 7$  Hz) relativo aos hidrogênios vizinhos ao átomo de enxofre do tioureido (H-3).



**Figura 82:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H em D<sub>2</sub>O.

O RMN de <sup>13</sup>C mostrou os carbonos contidos na molécula:  $\delta$  27,75 ppm (C-2),  $\delta$  29,63 ppm (C-1),  $\delta$  29,88 ppm (C-3),  $\delta$  30,29 ppm (C-6),  $\delta$  30,85 ppm (C-7) e  $\delta$  167,76 ppm (C-4).

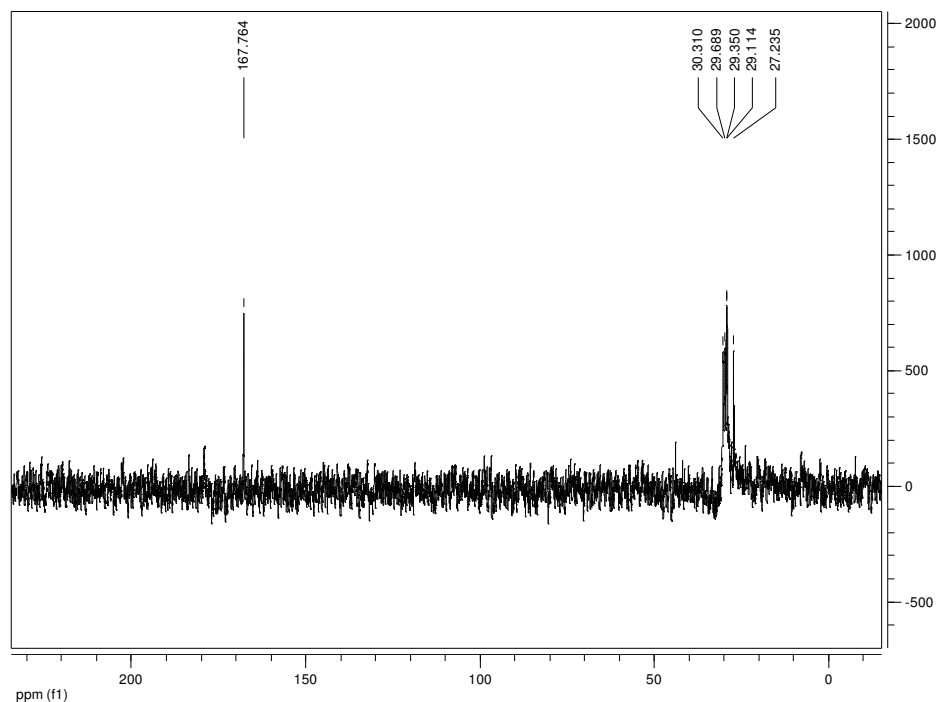


Figura 83: RMN <sup>13</sup>C de P7.

A análise de DEPT indicou as fases dos respectivos carbonos em sp<sup>3</sup>: δ 27,75 ppm (C-2), δ 29,63 ppm (C-1), δ 29,88 ppm (C-3), δ 30,29 ppm (C-6) e δ 30,85 ppm (C-7).

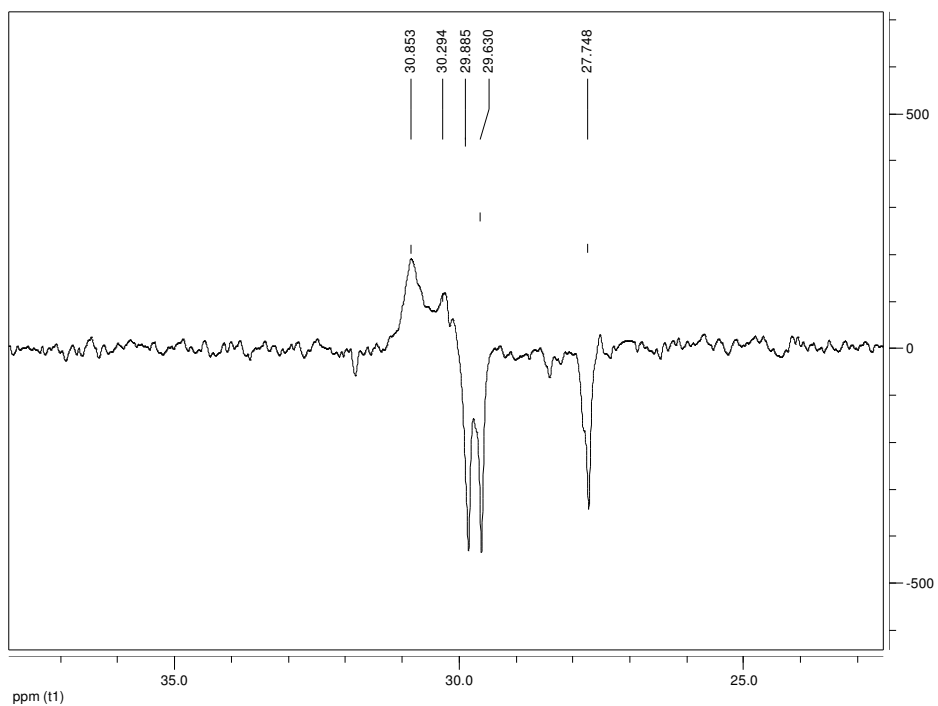


Figura 84: DEPT de P7.

#### IV.3- Determinação do $\log k_w$ para os compostos P1 a P7.

Primeiramente foi feita uma série de medidas experimentais com os tempos de retenção medidos em seis diferentes concentrações ou proporções de metanol/tampão MOPS, variando de 75 : 25 (vol/vol) até 25: 75 (vol/vol), com a finalidade de determinar o fator de capacidade (K) de cada composto em um determinado comprimento de onda máximo.

Com os diversos valores de  $\log K$  obtidos em diversas concentrações do agente modificador tem-se a correlação entre  $\log K$  e a composição da fase móvel ( $\varphi$ ) que fornece informações a respeito destes efeitos seletivos e conseqüentemente sobre a lipofilia dos padrões. Este é, portanto, o processo responsável pela retenção do soluto na fase estacionária apolar, que pode ser vista como um processo de associação reversível entre as cadeias de hidrocarbonetos da fase estacionária e as partes apolares do soluto<sup>140</sup>. O agente modificador (solvente orgânico que compõe a fase móvel juntamente com a água), exerce um efeito seletivo, principalmente na retenção de solutos polares<sup>154</sup>. Neste intervalo de concentrações há um comportamento linear que pode ser vista como uma boa aproximação na Equação 6.

Como já foi mencionado, em nosso grupo já foi feito um estudo da correlação entre os valores de  $\log K_w$  e  $\log P$ , obtendo-se a Equação 5. Com estes dados da padronização da coluna medimos então os valores de retenção para os nossos compostos estudados, dos quais se tem os valores descritos de  $\log K$  na Tabela 7 e os dados de  $\log k_w$  na Tabela 8. Com estes dados de  $\log K_w$  pode-se por correlação com os dados do gráfico da Figura 64 interpolar e avaliar os dados de  $\log P$  para os nossos compostos, tendo-se os resultados obtidos na Tabela 8. Contudo, pode-se observar que a variação dos dados não leva às conclusões de variação de lipofilia interpretáveis. Cabe ressaltar, contudo que já é discutido na literatura que a correlação entre  $\log K_w$  e  $\log P_{oct}$  apresenta alguns inconvenientes uma vez que solutos altamente lipofílicos e com estruturas mais complexas podem possuir  $\log P_{oct}$  não confiáveis. De fato, as nossas estruturas são mais ramificadas e complexas do que as dos padrões utilizados e além do mais a presença de grupos muito polares com possibilidade de formação de fortes interações de ligações de hidrogênio intramoleculares podem levar a espécies agregadas que dificultam a medida da lipofilia. Assim, tentar-se-á a determinação de lipofilia através de outras técnicas, tais como cromatografia delgada e “shake-flask” para obtenção de relações lineares entre os parâmetros lipofílicos medidos e a diferença de atividade biológica obtida conforme as diferenças estruturais entre os derivados estudados.

---

<sup>140</sup> Wells, M. J. M.; Randall C. C.; Patterson, R. M.; *J. Chromatogr.* **1982**, 235, 43. Tanaka, N.; Goodel, H.; Karger, B. L.; *J. Chromatogr.* **1978**, 158, 233. Tanaka, N.; Sakagami K.; Araki, M.; *J. Chromatogr.* **1980**, 199, 327. Miyake K.; Misuno, M.; Terada, H.; *J. Chromatogr.* **1988**, 439, 227.

**Tabela 7:** Valores de log k para as diferentes proporções de metanol para compostos de P1 a P7.

[MeOH]	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
25	-1,2852	-1,16036	-1,11934	-0,711	-0,95079	-0,77047	-0,37275
35	-1,3846	-1,46055	-0,94867	-0,99331	-1,17936	-1,25023	-0,67246
45	-1,31309	-1,06304	-1,26867	-0,82606	-1,07917	-1,00379	-0,84338
55	-1,70368	-0,96255	-1,14095	-1,10757	-0,99632	-1,53383	-1,23971
65	-1,85812	-0,54598	-0,871	-1,00748	-1,05996	-1,02875	-1,89742
75	-0,49762	-0,4674	-0,54421	-0,9706	-1,20436	-0,95657	-0,95694

\* Os valores em fundo cinza foram desprezados para obtenção da equação de reta.

**Tabela 8:** Valores de log  $k_w$  e log P calculados para P1 a P7.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
log $k_w$	-0,85	-1,84	-2,42	-0,84	-0,32	0,62	0,11
log P	9,68	15,9	19,6	9,61	6,34	0,43	3,64

#### IV.4- Avaliação da Atividade Antifúngica dos Compostos P1 a P7

As leveduras usadas para os testes antifúngicos são da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (ATCC 20001) e *C. krusei* (ATCC 32608), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. tropicalis* (ATCC 22019), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32608), *Candida dubliniensis* (CD22 - isolada clinicamente) estas foram repicadas em Agar *Sabouraud* Dextrose. Neste estudo a Anfotericina B foi o composto utilizado como padrão e os valores de concentração inibitória mínima (MIC) se encontram na Tabela 9. Os compostos estudados foram desprotonados em bicarbonato de sódio de maneira estequiométrica.

##### IV.4.a- Resultados de Atividade Antifúngica

A atividade biológica dos compostos foi avaliada a partir da menor concentração em que não são detectadas colônias de fungos em 24h e 48h. No caso de *C. neoformans*, em 72h também. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os compostos P1, P2, P3, P4, P5, P6 e P7 se encontra na Tabela 9. Entre todos os compostos testados, nesta classe de compostos tipo tioureido, o derivado tri-funcionalizado não-metilado P1 é de fato o mais ativo, apresentando inibição contra *Candida albicans* e *C. glabrata* em concentrações (0,49 µg/mL) comparáveis às de inibição por anfotericina B e fluconazol (quando comparados na grandeza mencionada) entretanto, P1 não apresentou tal atividade contra *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

*Candida albicans*, *C. glabrata* *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomyces cerevisiae* foram espécies mais sensíveis aos compostos P1 e P3, este último também apresentou atividade contra *C. krusei* (250 µg/mL). P5 foi ativo apenas contra *C. glabrata* (250 µg/mL), enquanto P6 foi ativo contra *C. glabrata* (125 µg/mL) *Cryptococcus neoformans* (125 µg/mL), *Saccharomyces cerevisiae* (125 µg/mL) e *C. parapsilosis* (125 µg/mL). P2 e P4 mostraram-se inativos contra todas as todas as leveduras dentro das concentrações testadas que foram entre 1000-0,30 µg/mL.



É possível notar que **P1** é um agente antifúngico promissor tão efetivo quanto os compostos comercialmente conhecidos (anfotericina B e fluconazol) quando se compara a concentração em  $\mu\text{g/mL}$ . A relação estrutura-atividade parece depender também do número de ramificações presentes na estrutura. Assim, dos compostos tri-substituídos, **P1** é o derivado menos alquilado com maior atividade antifúngica, **P2** é o tioureido tri-metilado e não apresentou atividade antifúngica e **P3** o tioureido hexa-metilado apresentou atividade razoável. Para os análogos tipo tetra-tioureido o aumento do grau de metilação aumenta a atividade antifúngica: o derivado octa-metilado, **P6**, é mais ativo do que o derivado tetra-metilado (**P5**) e o não-metilado (**P4**) não mostra nenhuma atividade. Uma explicação razoável para tal fato vem da possibilidade de ocorrer interações de hidrogênio intramoleculares - entre os átomos de nitrogênio e hidrogênio dos dois grupos tioureido da molécula que é claramente observado no espectro na região do IV de **P4**. A ocorrência deste tipo de interação intermolecular (ou intramolecular) é muito favorável em compostos com alta polaridade e alta simetria, como **P4**. Este derivado por apresentar dois pares de grupos nitrogênio-hidrogênio (NH) apresenta tal tipo de interação intramolecular, desta maneira não há nenhum grupo tioureido (responsável pela atividade antifúngica) livre para interagir no meio biológico.

**Tabela 9:** Concentração inibitória mínima dos compostos que apresentaram atividade biológica.

Produto MM (g/mol)	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) MIC(nmol/mL) <i>C. albicans</i>	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) MIC(nmol/mL) <i>C. glabrata</i>	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) MIC(nmol/mL) <i>C. dubliniensis</i>	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) MIC(nmol/mL) <i>C. krusei</i>	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) MIC(nmol/mL) <i>C. parapsilosis</i>	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) MIC(nmol/mL) <i>C. neoformans</i>	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) MIC(nmol/mL) <i>S. cerevisiae</i>
P1 (323)	0,49 (1,5)	0,49 (1,5)	> 1000 (>3095)	> 1000 (>3095)	> 1000 (>3095)	250 (>3095)	250 (>3095)
P2 (365)	> 1000 (>2740)	> 1000 (>2740)	> 1000 (>2740)	> 1000 (>2740)	> 1000 (>2740)	> 1000 (>2740)	> 1000 (>2740)
P3 (407)	250 (614)	250 (614)	> 1000 (2457)	250 (614)	> 1000 (2457)	250 (614)	250 (614)
P4 (468)	> 1000 (2137)	> 1000 (2137)	> 1000 (2137)	> 1000 (2137)	> 1000 (2137)	> 1000 (2137)	> 1000 (2137)
P5 (524)	> 1000 (1908)	250 (477)	> 1000 (1908)	> 1000 (1908)	> 1000 (1908)	> 1000 (1908)	> 1000 (1908)
P6 (580)	> 1000 (1724)	125 (216)	> 1000 (1724)	> 1000 (1724)	125 (216)	125 (216)	125 (216)
P7 (322)	250 (776)	125 (388)	>250 (776)	62 (192)	250 (776)	100 (310)	125 (388)
Anfotericina B (924)	0,25 (0,27)	0,5 (0,49)	4,0 (4,3)	1,0 (1,1)	0,5 (0,54)	31,3 (34)	1,0 (1,1)
Fluconazol (306)	1,95 (6,37)	32 (104)	4,0 (13,1)	1,0 (3,27)	0,9 (2,94)	> 1000 (3268)	16 (52,3)

➤  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , nesta concentração o composto é considerado inativo até a concentração máxima testada.

Quanto ao composto tioureido tetrametilado, ele não apenas apresentou um grande espectro atividade como também tem um baixo MIC, desta maneira é possível afirmar que quanto menor o número de ramificações no grupo tioureido, maior o espectro de atividade do composto.

Diante dos resultados obtidos, através da comprovação da atividade inibitória foram realizados testes de atividade fungicida.

#### IV.4.b- Teste de Atividade Fungicida

Os compostos que apresentaram atividade fungicida foram P6 e P7, o primeiro apresentou esta atividade na CFM de 125 µg/mL contra *C.nerformans*, o segundo apresentou atividade fungicida iniciando contra *S.cerevisiae* a CFM de 62 µg/mL onde cerca de 90% das leveduras foram mortas e *C.neoformans* com CFM a 125 µg/mL (Tabela 10). Na figura 65 é possível visualizar os dados da atividade fungicida de P7 contra *S.cerevisiae*.



**Figura 85:** Resultado do teste de ação fungicida, a atividade começa a 62 µg/mL, de baixo para cima: é nitidamente notável que há o desenvolvimento da cultura para controle de crescimento; a 250 µg/mL e a 125 µg/mL (com 90% do desaparecimento da cultura).

**Tabela 10:** Concentração fungicida mínima dos compostos P6 e P7.

Composto	CFM	<i>Sacharomice.Cerevisiae</i>	<i>Cryptococus.neoformans</i>
P6	(µg/mL)	>250	125
	(nmol/mL)	(431)	(216)
P7	(µg/mL)	62	125
	(nmol/mL)	(192)	(388)

Os compostos P6 e P7 são aminas com grupo 1,3-dimetil-tiourea e não apenas apresentaram atividade antifúngica como também atividade fungicida. Tais compostos não apenas inibem o desenvolvimento do fungo, como também faz com que a levedura não mais exista nas

concentrações mencionadas. Assim, estes derivados com altos níveis de alquilação, e com número par de ramificações, são os agentes fungicidas mais potentes.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa foram realizados testes de atividade inibitória de compostos bis-tioureido cuja fórmula geral se encontra na Figura 83, a partir dos resultados apresentados foi montada a Tabela 11 contendo a relação entre atividade antifúngica e grupo funcional central de todos os compostos bis-tioureido sintetizados até agora. Estes compostos foram testados contra *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*.



n = 3, X<sub>2</sub> = tioureido, Y = S, SO, SO<sub>2</sub>, NCH<sub>3</sub>

Figura 86: Estrutura geral dos compostos estudados em trabalhos anteriores.<sup>19</sup>

Tabela 11: Dados gerais da Atividade antifúngica dos compostos estudados nesta dissertação (P1 a P7) e em trabalhos anteriores (A-L).

Grupo Central	Grupo terminal	Produto	MIC* <i>C.albicans</i>	MIC* <i>C.glabrata</i>	MIC* <i>C.krusei</i>
S	Tioureia	A	>1000	>1000	3,1
S	1-metil-iouréia	B	31,3	31,3	31,3
S	1,3-dimetil-tioureia	P7	>1000	125	62
SO	Tioureia	C	>1000	>1000	>1000
SO	1-metil-tioureia	D	>1000	125	125
SO <sub>2</sub>	Tioureia	E	125	>1000	>1000
SO <sub>2</sub>	1-metil-tioureia	F	>1000	>1000	31,3
NCH <sub>3</sub>	Tioureia	I	250	>1000	>1000
NCH <sub>3</sub>	1-metil-tioureia	J	>1000	>1000	31,3
O	Tioureia	K	1,95	1,95	>1000
O	1-metil-tioureia	L	0,97	1,95	>1000
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SC(NH)NH <sub>2</sub>	Tioureia	P1	0,49	0,49	>1000
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SC(NH)NHCH <sub>3</sub>	1-metil-tioureia	P2	>1000	>1000	>1000
CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SC(NCH <sub>3</sub> )NHCH <sub>3</sub>	1,3-dimetil-2-tioureia	P3	250	250	>1000
NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N	Tioureia	P4	>1000	>1000	>1000
NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N	1-metil-tioureia	P5	>1000	250	>1000
NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N	1,3-dimetil-2-tioureia	P6	>1000	125	>1000

\* MIC (µg/mL)

Desta tabela é possível atestar que além da influência da lipofilia, ou do grau de alquilação dos compostos, o tipo de átomo presente do grupo central das moléculas (O, S, N) é importante para caracterizar a atividade antifúngica dos mesmos, sendo assim, os compostos simétricos tendo como grupo central o oxigênio foram os mais ativos apresentando uma concentração inibitória mínima muito baixa para espécies do tipo *C. albicans*, principalmente o composto oxigenado mais metilado foi o mais ativo. Os compostos sulfurados também apresentaram atividade biológica considerável tanto para *C. glabrata* quanto para *C. krusei*, neste caso, o aumento da lipofilia do composto influenciou na atividade biológica.

Desta forma o nível de lipofilia, de ramificação e mesmo grau de alquilação podem tanto aumentar a capacidade inibitória do composto como também diminuí-lo, isto depende da espécie estudada e da presença do grupo central. Adicionalmente, vemos que as substâncias estudadas neste trabalho parecem apresentar estruturas mais complexas e que deverão ser analisadas posteriormente por métodos computacionais.

#### IV-5- Avaliação da Atividade Antitumoral dos Compostos P1 e P2

Os compostos P1 e P2 foram submetidos a ensaios farmacológicos para avaliação da atividade citotóxica (ou antitumoral) contra algumas linhagens: adenocarcinoma gástrico humano (AGS), carcinoma de cólon murino (CT26WT), carcinoma mamário humano (MCF-7) e glioma de rato (C6). Os resultados obtidos estão na Tabela 12.

**Tabela 12:** Concentrações de atividade anticancerígena dos compostos P1 e P2.

Linhagem	P1	P2
AGS	$3,2 \times 10^{-5}$ mol/L	$3,0 \times 10^{-5}$ mol/L
CT26WT	$5,0 \times 10^{-5}$ mol/L	$5,0 \times 10^{-5}$ mol/L
MCF-7	$5,0 \times 10^{-5}$ mol/L	$5,0 \times 10^{-5}$ mol/L
C6	$4,0 \times 10^{-5}$ mol/L	$4,0 \times 10^{-5}$ mol/L

Os dados obtidos revelam uma atividade antitumoral ou citotóxica média para todos os compostos estudados na faixa de  $10^{-5}$  mol/L para todas as linhagens investigadas, contudo esta faixa de concentração não é considerada promissora para o desenvolvimento de novos agentes anti-neoplásicos. Cabe ressaltar que a avaliação dos dados mostra que não se observa discriminação entre os compostos estudados para que se possa efetuar um estudo de correlação estrutura-atividade apreciável.

## **V. PARTE EXPERIMENTAL**

### ***V.1. - Preparações efetuadas***

Os reagentes utilizados cuja preparação não está descrita foram adquiridos comercialmente (ALDRICH ®). Os solventes utilizados foram purificados por métodos descritos na literatura<sup>141</sup>.

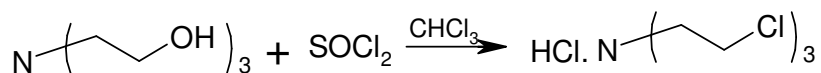
Os compostos foram purificados conforme descrito nos procedimentos de obtenção (item V. 2) e analisados, geralmente, por técnicas espectrométricas usuais (RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, DEPT e IV). Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C e DEPT) foram feitos pelos espectrômetros Brucker 200MHz do Departamento de Química da UFMG e pelos espectrômetros Varian modelo INOVA. Os deslocamentos químicos (δ) são relatados em partes por milhão em relação a tetrametilsilano (TMS), usado como padrão interno. Os solventes utilizados para esta análise foram água deuterada (D<sub>2</sub>O) e deuterodimetilsulfóxido (DMSO).

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro da Perkin-Elmer modelo Spectrum One do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Os pontos de fusão foram determinados pelos aparelhos Fisher-Johns, analógico e Microquímica Equipamentos Ltda. MQAPF-301 digital sem correção. Para a cromatografia em camada delgada foi utilizada sílica-gel 60G MERCK em lâminas de vidro. Como revelador foi utilizado o vapor de iodo ressublimado.

Para RP-HPLC foi utilizada uma coluna Rainin C8, 5 µm de 4,6 mm x 250 mm (com fase estacionária SIGMA ALDRICH). O aparelho utilizado para medidas foi um cromatógrafo líquido da marca SHIMADZU equipado com duas bombas LC-10AD, um detector ultravioleta SPD-6AV e LC-R6A do Grupo Nequim do Departamento de Química da UFMG, o programa de detecção utilizado foi CLASS-LC10 LC Workstation. A fase móvel foi constituída de metanol/solução de MOPS (ácido 3-[N-morfolino]-propanossulfônico) a pH 7,2 e o fluxo da fase móvel foi 0,3 mL/min. O sal utilizado na determinação do tempo morto da coluna foi o nitrato de sódio.

#### **V.1.2-PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE HALETOS DE ALQUILA: Preparação de tris-(2-cloroetil)amina (PA)**



<sup>141</sup> Riddick, J. A. E Bunger, W. B.; *Organic Solvent \_ Physical Properties and Methods of Purification. Techniques of Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 3ª ed, 1970; Assumpção, R. M. V E Morita, T.; *Manual de Soluções, Reagentes & Solventes*, Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1968.

Em um balão tritubulado de 250 mL, acoplado a condensador para refluxo, funil de adição, agitação magnética e banho de gelo, colocaram-se 9,20 g (61,7 mmol) de trietanolamina e 8,0 mL de clorofórmio anidro. Adicionaram-se, com o auxílio de um funil de adição de 50,0 mL, 18,0 mL (248 mmol) de cloreto de tionila solubilizados em 12,0 mL de clorofórmio. Deixou-se sob agitação magnética durante 2 h. Ao final da reação adicionaram-se 40,0 mL de benzeno anidro e esta solução foi submetida a evaporação em evaporador rotatório para retirada total do cloreto de tionila, obtendo 8,743 g (59 %) de um sólido branco.

PF.: 116-118 °C      FM.  $C_6H_{12}Cl_3N.HCl$       MM= 241 g/mol

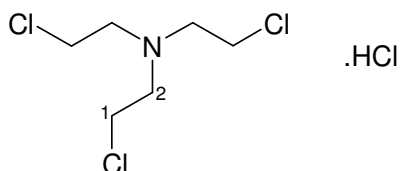
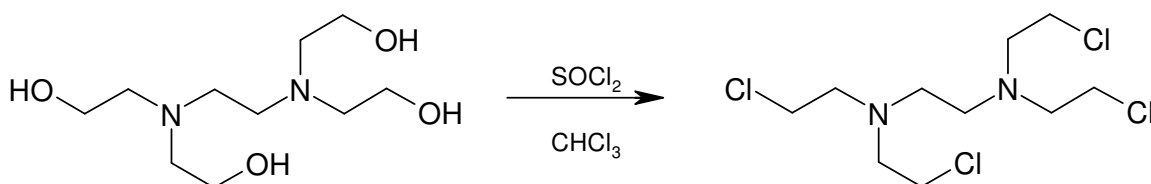


Tabela 16: Dados de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$  e IV de PA

RMN de $^1H$ ( $D_2O$ )				IV	
Atribuição	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)	Integração	Atribuição	$\nu$ ( $cm^{-1}$ )
H-1	3,71( <i>t</i> )	$J^{1,2}= 6$	6H	Def. axial (sim. e não-sim) N-H de amina terciária protonada	2470, 2423
H-2	3,92( <i>t</i> )	$J^{1,2}=6$	6H	Def. Axial de C-H <sub>2</sub>	2974, 2940, 2887, 2832
RMN de $^{13}C$ ( $D_2O$ )				Def. Angular de C-H <sub>2</sub>	1447, 1410
Atribuição	$\delta$ (ppm)	Atribuição	$\delta$ (ppm)	Def. Axial C-Cl	760
C-1	36,71	C-2	54,55		

#### V.1.2.1 - Preparação do N,N,N',N' - Tetrakis (2-cloroetil)etilenodiamina (PB)



Seguindo o procedimento geral V.1.2 fez-se reagir 9,33 g (39,5 mmol) de N,N,N',N' - Tetrakis (2-hidroxi)etil)etilenodiamina em 20,0 mL de clorofórmio anidro com 18,0 mL (248 mmol) de cloreto de tionila em 20,0 mL de clorofórmio. Adicionaram-se 20,0 mL de clorofórmio e deixou-se sob agitação magnética durante 2h. Ao final da reação adicionaram-se 40,0 mL de benzeno anidro e esta solução foi submetida a evaporação em evaporador rotatório para retirada total do cloreto de tionila e o produto bruto (óleo transparente e viscoso) foi utilizado para a próxima reação.

FM  $C_{10}H_{20}N_2Cl_4.2HCl$       MM 383 g/mol

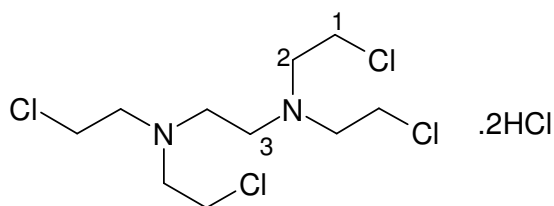


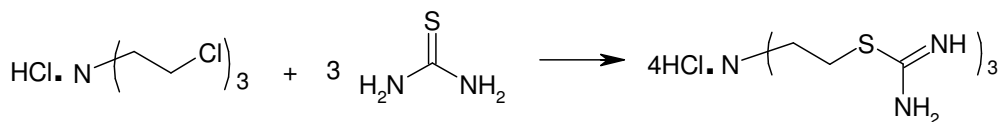
Tabela 17: Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e Dept de PB

RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ )				RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ )		Dept ( $\text{D}_2\text{O}$ )	
Atribuição	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)	Integração	Atribuição	$\delta$ (ppm)	Atribuição	$\delta$ (ppm)
H-1	3,42(t)	$J^{1,2} = 5$	8H	C-1	48,33	C-1	48,82
H-3	3,73(s)	-	4H	C-3	55,35	C-3	55,84
H-2	3,95(t)	$J^{1,2} = 5$	8H	C-2	55,65	C-2	56,14

Tabela 18: Dados de IV de PB

Atribuição	$\nu(\text{cm}^{-1})$
Def. axial (sim. e não-sim) N-H de amina protonada	3289
Def. Axial de C-H	2957, 2885
Def. Angular de C-H	1448
Def. Axial C-Cl	751

V.1.3 - PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE TRIS-TIOUREIDO-DERIVADOS: Preparação de tris(2-tioureidoetil)amina (P1) em EtOH



Em um balão tritubulado de 100 mL, dotado de agitação magnética e condensador para refluxo, contendo 1,00 g (4,15 mmol) de PA e 40,0 mL de álcool etílico, adicionou-se 1,056 g (13,9 mmol) de tiouréia. Manteve-se sob refluxo por 70 h com a reação sendo acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila; rf do produto: 0, rf da tiouréia: 0,6, rf do reagente: 1). Terminado o tempo de reação a mistura foi esfriada até temperatura ambiente, e levada à geladeira, filtrou-se o sólido formado e após secagem com pressão reduzida em dessecador dotado de pentóxido de fósforo, foram obtidos 1,064g (55%) de um sólido branco.

PF= 174-175 °C

FM =  $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{N}_7\text{S}_3 \cdot 4\text{HCl}$

MM= 469g/mol

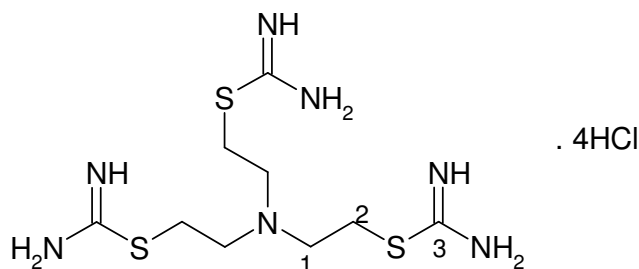


Tabela 19: Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e Dept de P1

RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ )				RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ )		Dept ( $\text{D}_2\text{O}$ )	
Atribuição	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)	Integração	Atribuição	$\delta$ (ppm)	Atribuição	$\delta$ (ppm)
H-2	3,35(t)	$J^{1,2} = 6$	6H	C-2	26,39	C-2	26,90
H-1	3,48(t)	$J^{2,1} = 6$	6H	C-1	51,76	C-1	52,26
				C-3	169,70		

Tabela 20: Dados de IV de P1

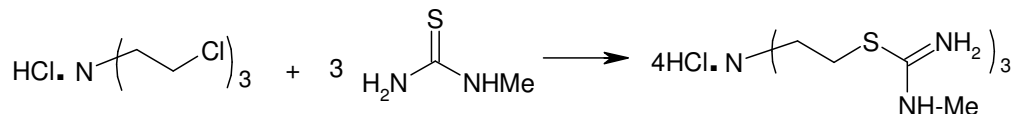
Atribuição	$\nu(\text{cm}^{-1})$	Atribuição	$\nu(\text{cm}^{-1})$
Def. Axial N-H de $\text{NH}_2$	3254	Def. Axial C=N	1647
Def. Axial (não-simétrica) N-H	3118	Def. Angular simétrica no plano (N-H)	1632
Def. Axial (simétrica) N-H	2986		
Def. Axial de C-H	2741,2454,2341		

### V.1.3.1-Preparação de tris(2-tioureido)etilamina (P1) em i-PrOH

Repetindo-se o procedimento geral descrito no item V.1.3, fizeram-se reagir 0,948 g (12,4 mmol) de tiouréia com 1,00 g (4,15 mmol) de PA em 30 mL de isopropanol a refluxo por cerca de 53 h (acompanhamento CCD com etanol e acetato de etila (4:1 vol/vol; rf do produto: 1,4, rf da tiouréia: 1, rf do reagente: 0,1). Obtiveram-se 1,802 g (92 %) de um sólido branco filtrado.

PF: 174-175 °C

### V.1.3.2-Preparação de tris(2-(1-metil-2-tioureidoetil)amina (P2) em EtOH



Seguindo-se o procedimento geral descrito no item V.1.3 reagiu-se 0,502 g (2,07 mmol) de PA com 0,619 g (6,86 mmol) 1-metil-2-tiouréia em 40mL de álcool etílico. Após refluxo por 48 h (acompanhamento por CCD; acetato de etila ; rf do produto: 0, rf do reagente:1). Após o fim da reação e adição de 30 mL de acetato de etila, filtração e secagem à pressão reduzida, obtiveram-se (55%) de um sólido branco.

PF= 198-200 °C

FM =  $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{S}_3 \cdot 4\text{HCl}$

MM= 511g/mol



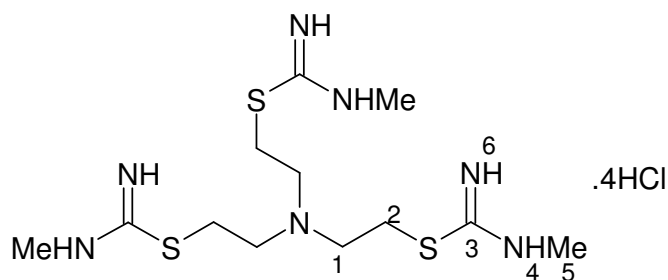


Tabela 21: Dados de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e Dept de P2

RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ )				RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{D}_2\text{O}$ )		Dept ( $\text{D}_2\text{O}$ )	
Atribuição	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)	Integração	Atribuição	$\delta$ (ppm)	Atribuição	$\delta$ (ppm)
H-5	2,92(s)	-	9H	C-2	26,34	C-2	27,03
H-2	3,17(t)	$J^{1,2} = 7$	6H	C-5	30,36	C-5	30,68
H-1	3,33(t)	$J^{4,1} = 6,0$	6H	C-1	52,19	C-1	52,47
N-H	3,55(q)	$J^{4,5} = 7$	3H	C-3	165,80		

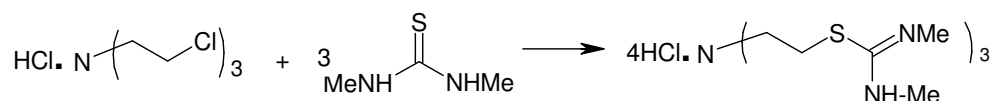
Tabela 22: Dados de IV de P2

Atribuição	$\nu(\text{cm}^{-1})$	Atribuição	$\nu(\text{cm}^{-1})$
Def. Axial N-H (não-simétrica) de $\text{NH}_2$	3431	Def. Axial de C-H	2796,2649,2565
Def. Axial N-H (simétrica) de $\text{NH}_2$	3078	Def. Axial C=N	1646
Def. Axial (não-simétrica) N-H	2971	Def. Angular simétrica no plano (N-H)	1610
Def. Axial (simétrica) N-H	2928	Def. angular $\text{CH}_3$	1441

### V.1.3.3 - Preparação de tris(2-(1-metil-2-tioureidoetil)amina (P2) em *i*-PrOH

Seguindo-se o procedimento geral descrito no item V.1.3 (porém, com adição de 0,207 g de iodeto de potássio) reagiu-se 1,122 g (12,45 mmol) de 1-metil-2-tioureia com 1,000 g de trimustina em 30mL de isopropanol sob refluxo por 53h (acompanhamento por CCD; eluente etanol/acetato de etila 4:1; rf. do produto: 0,28) desligou-se o aquecimento. Após o final da reação, diminuição do volume total por evaporação e adição 30 mL de acetato de etila há precipitação de um sólido. Após a filtração a pressão reduzida e secagem, obteve-se 1,059 g (49%) de um sólido branco. PF = (201-204) °C MM = 511 g/mol FM =  $\text{C}_{12}\text{H}_{31}\text{Cl}_4\text{N}_7\text{S}_3$

### V.1.3.4- Preparação de tris(2-(1,3-dimetil)-tioureidoetil)amina (P3) em *i*-PrOH



Seguindo-se o procedimento geral descrito no item V.1.3 (porém, com adição de 0,207g (1,25 mmol) de iodeto de potássio) reagiu-se 1,297 g (12,45 mmol) de 1,3-dimetil-2-tioureia com 1,000 g (3,15 mmol) de PA em 30 mL de isopropanol. Após refluxo por 43 h (acompanhamento por CCD;

eluente etanol/acetato de etila 4:1; rf. do produto: 0,1) a mistura foi concentrada e adicionou-se 30 mL de acetato de etila e filtração a pressão reduzida e secagem, obtiveram-se 1,910 g (83%) de um óleo extremamente viscoso de coloração branca.

MM = 553 g/mol

FM = C<sub>15</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>S<sub>3</sub>. 4HCl

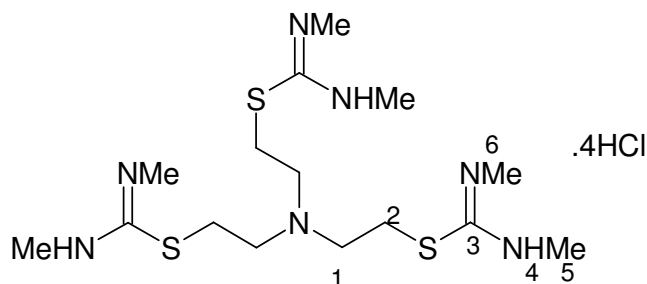


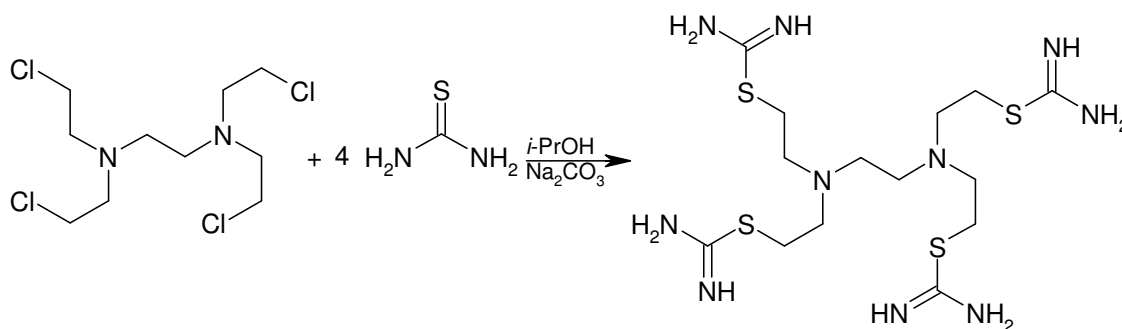
Tabela 23: Dados de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e Dept de P3

RMN de <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O)				RMN de <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O)		Dept (D <sub>2</sub> O)	
Atribuição	δ(ppm)	J(Hz)	Integração	Atribuição	δ(ppm)	Atribuição	δ(ppm)
H-5	2,89(s)	-	18H	C-2 (CH <sub>2</sub> -S)	27,18	C-2	27,67
H-6	2,98(s)	-		C-5 (NHCH <sub>3</sub> )	29,94	C-5	30,43
H-2	3,27(t)	J <sup>2,1</sup> = 6 Hz	6H	C-4 (=NCH <sub>3</sub> )	30,70	C-4	31,19
H-1	3,39(t)	J <sup>1,2</sup> = 6 Hz	6H	C-1 (CH <sub>2</sub> -N)	51,32	C-1 (CH <sub>2</sub> -N)	51,80
H-4	3,52(q)	-	-	C-3	166,88		

Tabela 24: Dados de IV de P3

Atribuição	v(cm <sup>-1</sup> )	Atribuição	v(cm <sup>-1</sup> )
Def. Axial (não-simétrica) N-H	3159	Def. Angular simétrica no plano (N-H)	1617
Def. Axial (simétrica) N-H	2969	Def. angular CH <sub>3</sub>	1525, 1455
Def. Axial de C-H	2538	Def. Axial C-S	712
Def. Axial CN	1705		

#### V.1.4 - PROCEDIMENTO GERAL PARA OBTENÇÃO DE TETRA-TIOUREIDO-DERIVADOS: Obtenção de N,N,N',N' - tetrakis (2-tioureidoetil) etilenodiamina (P4) em presença de Carbonato de sódio



Seguindo-se o procedimento geral descrito no item V.1.3 (porém, com adição de 0,691 g de carbonato de sódio) reagiu-se 0,982 g (12,90 mmol) de tiouréia com 1,000 g (3,220 mmol) de PB

em 50mL de isopropanol sob refluxo por 44 h (acompanhamento por CCD (eluentes: clorofórmino/etanol/hexano: 5:4:1- r.f. da tiouréia 0,89; r.f. do PA 0,37; r.f. do produto 0,11). Após resfriamento da mistura reacional na geladeira, obteve-se um sólido que foi retirado por filtração e a solução gerada foi concentrada a pressão reduzida. Após evaporação obteve-se um sólido alaranjado (929 mg, 61%) que se mostrou muito higroscópico, mesmo apesar de ter sido secado.

FM = C<sub>14</sub>H<sub>32</sub>N<sub>10</sub>S<sub>4</sub>      MM = 468g/mol

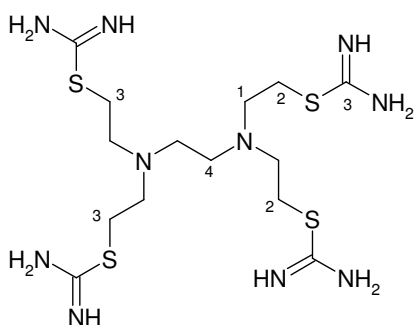


Tabela 25: Dados de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e Dept de P4

RMN de <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O)				RMN de <sup>13</sup> C		DEPT	
Atribuição	δ(ppm)	J(Hz)	Integração	Atribuição	δ(ppm)	Atribuição	δ(ppm)
H-2	3,50(t)	J <sup>2,1</sup> = 5	8H	C-2	50,82	C-2	48,40
H-5	3,86(s)	-	4H	C-4	55,22	C-1	55,83
H-2 e H-4	3,98(t)	J <sup>1,2</sup> = 5	8H	C-1	58,40	C-4	56,03
				C-3	181,70		

Tabela 26: Dados de IV de P4

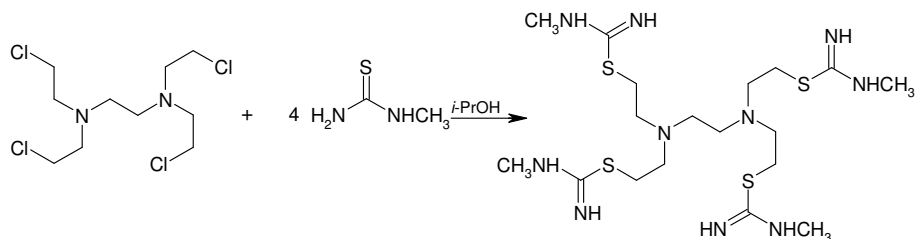
Atribuição	v(cm <sup>-1</sup> )	Atribuição	v(cm <sup>-1</sup> )
Def. Axial (não-simétrica) N-H	3273	Def. Axial NC-H	1398
Def. Axial (simétrica) N-H	3165	Def. Axial C-N	1071
Def. Axial de C-H	2959, 2887, 2826	Def. Axial C-S	727
Def.axial C=N (ligada a N)	1602		

#### V.1.4.1 - Obtenção do N,N,N',N'-Tetrakis(2-tioureidoetil) etilenodiamina (P4) sem carbonato de sódio

Conforme o procedimento no item V.1.3 (mas com adição de 0,276g (1,66mmol) de iodeto de potássio), fez-se reagir 1,277g (16,78mmol) de tiouréia em 40mL de isopropanol e 1,290 g (4,16 mmol) de N,N,N',N'-tetrakis(2-cloroetil)etilenodiamina em 10mL de isopropanol, após 48h de refluxo, deixando-se sob refluxo por mais 3h. Após cristalização da mistura reacional na geladeira, obteve-se um sólido que foi retirado por filtração e o filtrado foi concentrado a pressão reduzida, do qual obteve-se um sólido amarelado que foi secado em dessecador sob pressão reduzida com P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> gerando 1,273 g (50 %).

PF = 140-146 °C      FM = C<sub>14</sub>H<sub>32</sub>N<sub>10</sub>S<sub>4</sub>.4HCl      MM = 614 g/mol

### V.1.4.2 - Obtenção do N,N,N',N'-tetrakis(2-metil-tioureido-etil)etilenodiamina (P5)



Segundo-se o procedimento geral descrito no item IV.1.3 (com adição de 0,215 g (1,30 mmol) de iodeto de potássio) reagiu-se 1,160 g (12,87 mmol) de 1-metil-2-tioureia com 1,000 g (3,22 mmol) de N,N,N',N'-tetrakis-2-cloroetil-etilenodiamina em 30 mL de isopropanol. Após refluxo por 50 h (acompanhamento por CCD; eluentes: etanol/acetato de etila (4:1) rf. do produto: 0,2). Após resfriamento da mistura reacional observo-se a formação de duas fases: uma densa e viscosa e outra com isopropanol, esta última foi filtrada e concentrada à pressão reduzida, obtendo-se 1,059 g (49%) de um sólido branco que foi seco no dessecador com pentóxido de fósforo.

PF = 105-108 °C

FM = C<sub>18</sub>H<sub>40</sub>N<sub>10</sub>S<sub>4</sub>·4HCl

MM = 670 g/mol

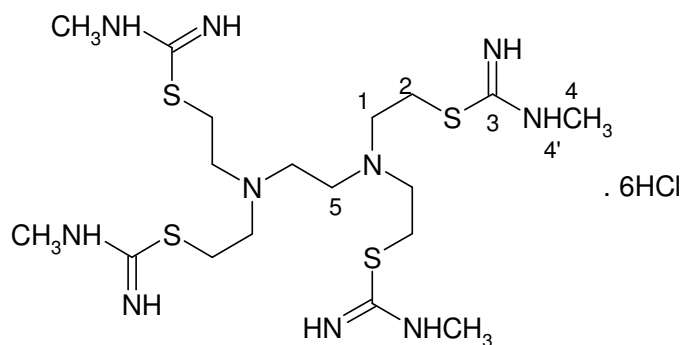


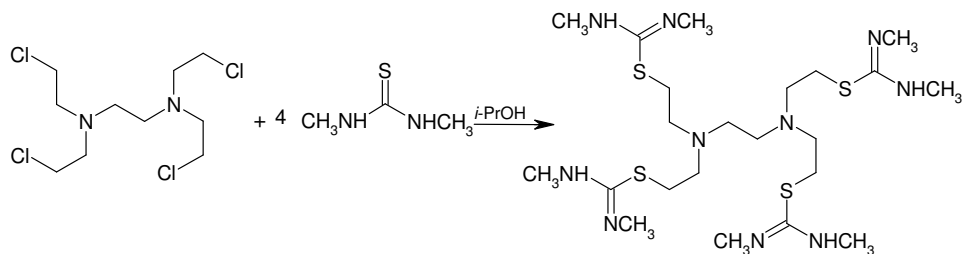
Tabela 27: Dados de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e Dept de P5

RMN de <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O)				RMN de <sup>13</sup> C		DEPT	
Atribuição	δ(ppm)	J(Hz)	Integração	Atribuição	δ(ppm)	Atribuição	δ(ppm)
H4 e H4'	2,88 e 2,74(s)	-	20H	C-4	29,45 e 31,20	C-4	29,95 e 31,73
H-2	3,05(t)	J <sup>2,1</sup> = 5	8H	C-2	50,05	C-2	50,54
H-5	3,19(s)	-	4H	C-5	54,74	C-5	56,24
H-1	3,76(t)	J <sup>1,2</sup> = 5	8H	C-1	56,93	C-1	57,42
				C-3	178,16		

Tabela 28: Dados de IV de P5

Atribuição	v(cm <sup>-1</sup> )	Atribuição	v(cm <sup>-1</sup> )
Def. Axial (assimétrica) N-H protonado	3366, 3245	Def.axial C=N (ligada a N)	1625
Def. Axial (simétrica) N-H protonado	3164	Def.axial C=S (ligada a N)	1544,1294
Def. Axial de C-H	2970	Def. Axial C-N	1122
Def. axial N-H banda de combinação	2097	Def. Axial C-S	714

### V.1.4.3 - Obtenção do N,N,N',N'-tetrakis(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)etileno-diamina (P6)



Seguindo-se o procedimento geral descrito no item IV.1.3 (com adição de 0,214 g (1,29 mmol) de iodeto de potássio), reagiu-se 1,341 g (12,87 mmol) de 1,3-dimetil-2-tiouréia com 1,000 g (3,22 mmol) de N,N,N',N'-tetrakis-2-cloroetil-etileno-diamina em 30 mL de isopropanol. Após refluxo por 46 h (acompanhamento por CCD: eluentes: clorofórmio/etanol/hexano (5:4:1); rf. do produto: 0,2) desligou-se o aquecimento. Após o fim da reação esfriou-se, filtrou-se e concentrou-se o filtrado obtendo-se 1,465 g (80%) de um óleo amarelo escuro.

FM =  $C_{18}H_{40}N_{10}S_4 \cdot 4HCl$       MM = 726 g/mol

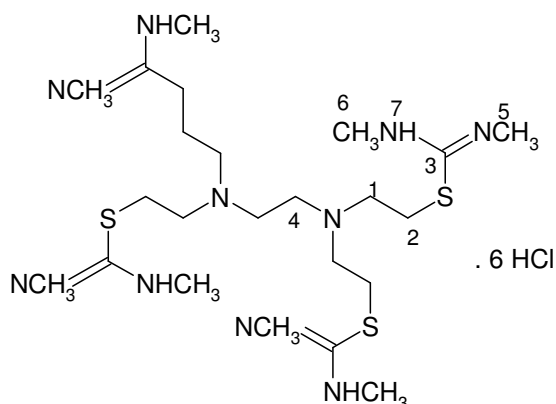


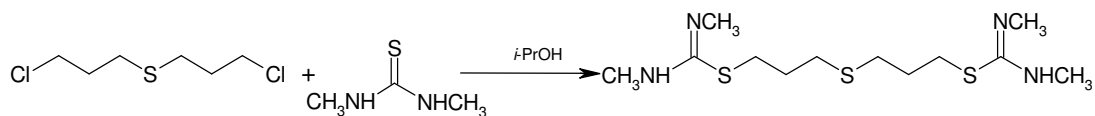
Tabela 29: Dados de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$  e Dept de P6

RMN de $^1H$ ( $D_2O$ )				RMN de $^{13}C$ (DMSO)		DEPT (DMSO)	
Atribuição	$\delta$ (ppm)	J(Hz)	Integração	Atribuição	$\delta$ (ppm)	Atribuição	$\delta$ (ppm)
H-4-H-5	2,92(s)	-	24H	C-6	18,93	C-6	19,41
H-2	3,19(t)	5,2	8H	C-2	31,38	C-2	27,77
H-6	3,35(s)	-	4H	C-4	51,24	C-5	31,87
H-1	3,69(t)	5,2	8H	C-1	56,38	C-4	51,73
				C-3	166,04	C-1	56,86

Tabela 30: Dados de IV de P6

Atribuição	$\nu$ ( $cm^{-1}$ )	Atribuição	$\nu$ ( $cm^{-1}$ )
Def. Axial de N-H	3252	Def. angular $CH_3$	1440
Def. Axial de $CH_2$	2941	Def. Axial C-N	1034
Def. axial C=N (ligada a N)	1501	Def. Axial C-S	663
Def. angular sim. No plano N-H	1555		

### V.1.5 - Obtenção de 1,7-bis-(2-1,3-dimetil-tioureido-etil)-4-tia-heptano (P7)



Seguindo-se o procedimento geral descrito no item V.1.3 reagiu-se 0,671 g (6,44 mmol) de 1,3-dimetil-2-tiouréia com 0,602 g (3,22 mmol) de 1,7-dicloro-3-tia-propano em 30mL de isopropanol. Após refluxo por 7,5 h (acompanhamento por CCD: eluente: acetato de etila; rf. do produto: 0,68). Resfriou-se a mistura reacional até a temperatura ambiente, filtrou-se e concentrou-se a solução. Após purificação em coluna cromatográfica de sílica usando como eluente mistura de etanol/acetato de etila (6:1 v/v) e evaporação do solvente, obteve-se 0,726 g (57%) de um óleo marrom claro.

FM = C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>S<sub>3</sub>.2HCl      MM= 395 g/mol

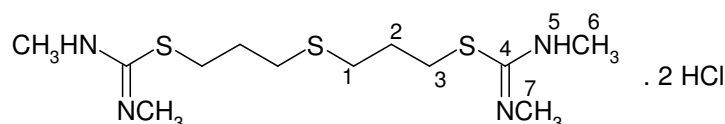


Tabela 31: Dados de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e Dept de P7

RMN de <sup>1</sup> H (D <sub>2</sub> O)				RMN de <sup>13</sup> C (D <sub>2</sub> O)		Dept (D <sub>2</sub> O)	
Atribuição	δ(ppm)	J(Hz)	Integração	Atribuição	δ(ppm)	Atribuição	δ(ppm)
H-2	1,89 ( <i>quinteto</i> )	J <sup>2,1</sup> = J <sup>2,3</sup> = 7 Hz	4H	C-2	27,24	C-2	27,75
H-1	2,59 ( <i>t</i> )	J <sup>1,2</sup> = J <sup>1,3</sup> = 7 Hz	4H	C-1	29,11	C-1	29,63
H-6	2,90 ( <i>d</i> )	J <sup>5,6</sup> = 9 Hz	12H	C-3	29,35	C-3	29,88
H-7	2,78 ( <i>s</i> )	-		C-6	29,69	C-6	30,29
H-3	3,12 ( <i>t</i> )	J <sup>3,2</sup> = J <sup>3,4</sup> = 7 Hz	4	C-7	30,31	C-7	30,85
				C-4	167,76		

Tabela 32: Dados de IV de P7

Atribuição	v(cm <sup>-1</sup> )	Atribuição	v(cm <sup>-1</sup> )
Def. Axial (assimétrica) N-H	3173	Def.axial C=S (ligada a N)	1556, 1520
Def. Axial (simétrica) N-H	2939	Def. Axial C-N	1257, 1038
Def.axial C=N (ligada a N)	1614	Def. Axial C-S	666

### V.2 - DETERMINAÇÃO DO LOG K<sub>w</sub> PARA OS COMPOSTOS P1 A P7.

Os parâmetros de lipofilia para os compostos sintetizados neste trabalho foram calculados a partir dos dados obtidos em um cromatógrafo com coluna Rainin C-8, 5 μm de 4,6 mm x 250 mm (com fase estacionária SIGMA ALDRICH). Usou-se uma coluna, preparada com fase estacionária obtida comercialmente. Esta coluna é constituída de cadeias alquílicas de oito carbonos quimicamente ligados ao oxigênio da sílica, por esta razão denominada octilsilano (C8). A fase móvel foi constituída de metanol e solução tampão de MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanossulfônico) a pH 7,2 e fluxo móvel de 0,3 mL/min, o tempo morto foi determinado a partir do nitrato de sódio.

Os tempos de retenção foram medidos em seis diferentes proporções de metanol/tampão MOPS, variando de 75 : 25 (vol/vol) até 25: 75 (vol/vol), com a finalidade de determinar o fator de capacidade (K) de cada composto em um determinado comprimento de onda máximo.

$$K = (t_r - t_o) / t_o \quad \text{Equação 4}$$

onde:  $t_r$  = tempo de retenção do composto,  $t_o$  = tempo morto

A partir da determinação do fator de capacidade (K), calculou-se o log K para os compostos P1 a P7 que podem ser vistos na Tabela 8.

Os coeficientes de partição podem ser correlacionados através da equação de Collander<sup>142</sup> neste caso uma vez que log P e log K são parâmetros hidrofóbicos obtidos em diferentes sistemas a equação de Collander pode ser escrita como:  $\log P_{oct} = a \log K_w + b$  (Equação 5)

onde, a e b são constantes características do agente modificador empregado juntamente com uma solução tampão de pH igual a 7,2 (MOPS), neste caso, o metanol.

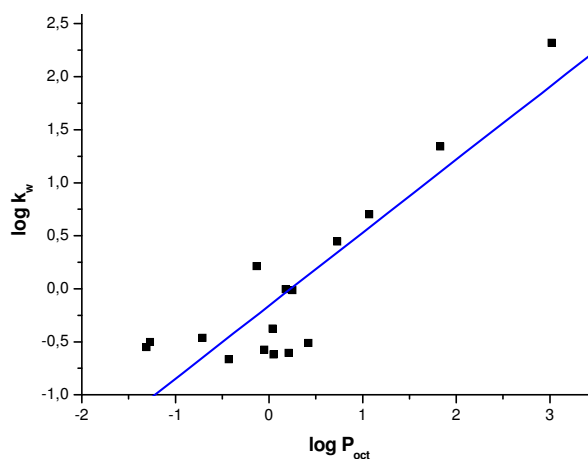
Tabela 33: Valores de log K para os padrões utilizados para diferentes porcentagens de metanol.

PADRÕES*	log k para as diferentes porcentagens de MeOH ( $\varphi$ )					
	25	35	45	55	65	75
1-CLA	0,642	0,517	0,004	-0,192	-0,411	-0,663
2-HBZ	-0,424	-0,572	-0,790	-0,927	-1,080	-1,253
3-TBA	0,082	-0,112	-0,346	-0,689	-0,854	-0,997
4-BUT	1,566	1,105	0,646	0,350	0,063	-0,167
5-FTU	-0,064	-0,285	-0,504	-0,665	-0,879	-1,118
6-MTU	-0,727	-0,814	-1,016	-1,090	-1,170	-1,270
7-ACA	-0,885	-1,011	-1,112	-1,274	-1,383	-1,500
8-ACP	-0,753	-0,880	-1,002	-1,094	-1,150	-1,300
9-IPA	-0,883	-0,969	-1,071	-1,196	-1,301	-1,405
10-ABN	0,179	-0,135	-0,400	-0,607	-0,811	-1,003
11-PTM	-0,738	-0,830	-0,920	-0,980	-1,017	-1,116
12-BER	-0,735	-0,820	-0,890	-0,950	-1,036	-1,068
13-AFA	-0,869	-0,944	-1,018	-1,099	-1,158	-1,259
14-DOT	-0,687	-0,767	-0,860	-0,900	-0,944	-1,003
15-PAF	-0,463	-0,518	-0,557	-0,589	-0,632	-0,660
16-CAF	-0,065	-0,268	-0,400	-0,508	-0,577	-0,757
17-CPN	-0,229	-0,340	-0,470	-0,567	-0,615	-0,723
18-EDT	-0,878	-0,982	-1,065	-1,167	-1,222	-1,331
19-DTP	-1,003	-1,135	-1,499	-1,590	-1,775	-1,780
20-NPD	-0,820	-0,956	-1,068	-1,032	-1,110	-1,299

\* (1) 4-cloroanilina (2) 4-hidroxibenzamida (3) 4-terbutilanilina (4) 4-butilanilina (5) Ácido 1,4,7,10-tetraazociclododecano-N,N',N'',N'''-tetracético (DOTA) (6) Ácido 1,1,4,7,7-dietilenotriaminopentacético (DTPA) (7) p-aminofenol (8) Cafeína (9) 3-cloropropionitrila (10) Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA-bisódico) (11) Feniltioureia (12) 1-metil-2-tioureia (13) Pentamidina (14) 4,4'-(1-triazeno-1,3-diil)-bis[benzenocarboximidamida] (Berenil) (15) Ácido 4-aminofenilacético (16) 4-aminobenzonitrila (17) Ácido cloroacético (18) Ácido cloropropiônico (19) Isopropilamina (20) N,N'-bis(3-aminopropil)1,3-propanodiamino

**Tabela 34:** Valores do  $\log P_{\text{oct}}$  obtidos na literatura e  $\log k_w$  para todos os padrões cromatográficos.

PADRÕES	Log $k_w$ (C8)	Log $P_{\text{oct}}$	PADRÕES	Log $k_w$ (C8)	log $P_{\text{oct}}$
1-CLA	1,341	1,83	11-PTM	-0,575	2,47
2-HBZ	-0,012	0,25	12-BER	-0,578	1,64
3-TBA	0,652	2,70	13-AFA	-0,676	0,94
4-BUT	2,320	3,02	14-DOT	-0,552	-1,31
5-FTU	0,444	0,73	15-PAF	-0,375	0,04
6-MTU	-0,463	-0,71	16-CAF	0,213	-0,13
7-ACA	-0,573	-0,05	17-CPN	-0,006	0,18
8-ACP	-0,510	0,42	18-EDT	-0,666	-0,43
9-IPA	-0,605	0,21	19-DTP	-0,621	0,05
10-ABN	0,701	1,07	20-NPD	-0,501	-1,27



**Figura 87:** Correlação entre  $\log k_w$  e  $P_{\text{oct}}$  para os padrões cromatográficos.

Os valores de  $K_w$  foram obtidos a partir da extrapolação dos valores de  $\log K$  calculados a partir do tempo de retenção do nitrato de sódio e do tempo de retenção de cada composto, em diferentes concentrações de agente modificador (Tabela 33), através da equação da reta para 0% de metanol. Desta maneira,  $\log k = B[\text{MeOH}] + A$

Onde,  $a$  e  $b$  são constantes do agente modificador (metanol) e  $[\text{MeOH}]$  é a porcentagem de metanol do sistema. Os valores de  $\log$  de  $k_w$  que foram interpolados na **Equação 5**.



**Tabela 35:** Valores calculados de fatores de capacidade (K) para as diferentes concentrações de compostos de P1 a P7.

Valor de K x % MeOH							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
25	0,05	0,07	0,08	0,19	0,11	0,17	0,42
35	0,04	0,03	0,11	0,10	0,07	0,06	0,21
45	0,05	0,09	0,05	0,15	0,08	0,10	0,14
55	0,02	0,11	0,07	0,08	0,10	0,03	0,06
65	0,01	0,28	0,13	0,10	0,09	0,09	0,01
75	0,32	0,34	0,29	0,11	0,06	0,11	0,11

**Tabela 36:** Correlação entre log K e concentração de metanol

	A	B	R	SD	N	P
P1	-0,84972(+0,19008)	-0,1465(+0,0405)	-0,90206	0,12797	5	0,03625
P2	-1,8446 (+0,24055)	0,1803(+0,04553)	0,89259	0,19045	6	0,01669
P3	-2,4222(+0,1956)	0,02443(+0,0032)	0,98323	0,0716	4	0,01677
P4	-0,84495(+0,09619)	-0,0402(+0,0173)	-0,80255	0,06641	5	0,10215
P5	-0,32213(+0,44255)	-0,2044(+0,1066)	-0,80485	0,23826	4	0,19515
P6	0,62231(+0,24355)	-0,3617(+0,0516)	-0,97076	0,16327	5	0,00598
P7	0,10752(+0,22175)	-0,20626(+0,0534)	-0,93906	0,11939	4	0,06094

### V.3 - ESTUDOS DE ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

#### V.3.1-Considerações Gerais

Estes testes foram realizados no laboratório de microbiologia no instituto de ciências biológicas da UFMG para todos os derivados sintetizados P1 a P9.

#### V.3.2 - Técnica da microdiluição

A microdiluição (diluição em caldo, realizada em placa de microdiluição) foi realizada em placas plásticas esterilizadas de microdiluição com fundo chato contendo oito séries identificadas de A a H, cada qual com 12 poços (total de 96 poços) (Figura 88).

Os ensaios foram preparados, inicialmente, com 4 diferentes concentrações finais (em µg/mL) de cada amostra examinado. Nos poços de 2 a 5 e 8 a 11 foram colados 100 µL de diferentes concentrações de amostra, com auxílio de pipeta multicanal . Os poços 1, 6,7 e 12 foram usados para controle do ensaio.



**Figura 88:** Placa de elisa utilizada para teste em microdiluição.

Na preparação de cada microorganismo, inicialmente, foi feita diluição em solução salina esterilizada, e depois diluição em RPMI-1640. Esta preparação da solução-trabalho, foi realizada para se obter o dobro da concentração final desejada, visto que posteriormente adicionou-se igual volume de solução contendo a amostra examinada. A seguir, volumes de 100 µL de suspensão balanceada de inóculo-RPMI-1640 foram transferidos para os orifícios da placa de microdiluição, contendo 100 µL de duas vezes as concentrações finais a serem examinadas, de modo que em cada poço foi adicionado um volume total de 200 µL de solução.

Os inóculos referentes a cada microorganismo foram adicionados em cada concentração de amostra em duplicata. Adicionalmente, poços pertencentes à coluna identificada com os números 1, 6, 7 e 12 em cada placa de microdiluição são utilizados como controle de esterelidade 1 e 6 e os poços 7 e 12 para controle de crescimento da levedura. No controle de esterelidade (negativo), foram colocados apenas RPMI-1640 e, no controle de crescimento (positivo), somente a solução balanceada do meio e o inóculo. No momento da leitura, o crescimento de microorganismos no controle positivo, tem a finalidade de mostrar a viabilidade da cultura usada e seu crescimento é comparado visualmente, ao crescimento verificado nos poços referentes às diferentes amostras testadas. No caso das cultura contendo *C. tropicalis* não se observou crescimento. No controle negativo, pela ausência de inóculo não pode haver crescimento de microorganismos. Esse controle é muito importante, pois ele indica se o meio de cultura está isento de microorganismos que possam causar contaminação (fungos, bactérias, etc.).

### **V.3.3 - Solventes utilizados na solubilização**

Para solubilização dos compostos sintetizados (P1-P7), foi utilizado o próprio RPMI 1640 (SIGMA) no teste de micro diluição.

### **V.3.4 - Meio de cultura**

O meio de Agar Sabouraud Dextrose (ASD) foi utilizado para a manutenção das culturas fúngicas. Para os testes de microdiluição, usou-se o meio de RPMI 1640 (SIGMA) tamponado com ácido-2-(N-morfolino)-propanosulfônico (MOPS).

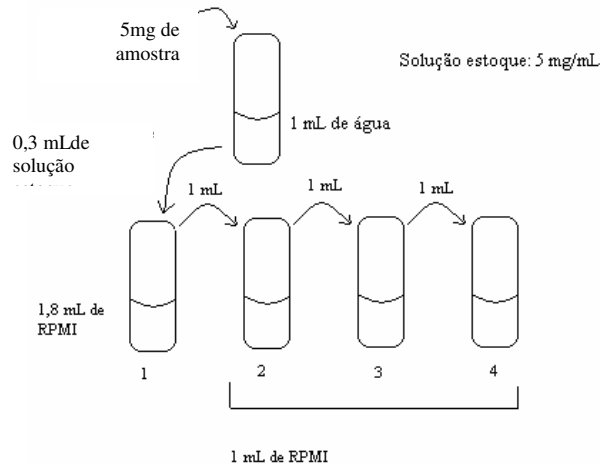
### **V.3.5 - Origens dos microrganismos utilizados nos ensaios**

As leveduras usadas para os testes antifúngicos são da American Type Culture Collection (ATCC): *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (ATCC 20001) e *C. krusei* (ATCC 32608), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. tropicalis* (ATCC 22019) , *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32608), *Candida dubliniensis* (CD22isolada clinicamente).

### **V.3.6- Avaliação da Atividade Antifúngica dos Compostos P1 a P7**

As espécies de *Cândida spp.* e *S. cerevisiae* foram subcultivadas em meio ASD, 24 horas antes da realização dos testes e mantidas a 35 °C, já o *C. neoformans* foi subcultivado da mesma

maneira, porém 72 h antes da inoculação (Documento NCCLS M-27-A, 2002).<sup>143</sup> 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 tubo falcon a cultura, com auxílio de uma alça de platina. Ajustou-se a concentração desta suspensão salina em espectrofotômetro a 530 nm, até obter uma transmitância entre 75 a 77% . 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.<sup>144</sup>



**Esquema 3:** Diluição seriada das amostras.

Todas as amostras testadas foram devidamente desprotonadas com bicarbonato de sódio em proporção molar correspondente (bis- ou hexa-equimolar). Foram preparadas soluções estoque 5 mg/mL e, a partir de cada uma delas foram preparadas quatro outras soluções com as respectivas concentrações de compostos: 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL. Foram transferidos 100 µL de cada solução para uma placa de elisa de maneira que as concentrações de fato testadas, após incubação foram: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL e 62,5 µg/mL e 31,3 µg/mL. A placa foi selada com um papel filme, incubada a 35 °C pelo tempo estabelecido para cada espécie e a leitura feita visualmente. As CIMs (concentrações inibitórias mínimas), foram consideradas como a menor concentração em que a amostra testada inibiu totalmente o crescimento do microorganismo, em relação ao controle de crescimento, após a incubação e foram expressas em µg/mL e µmol/mL.

À medida que um determinado composto apresentava atividade inibitória na mínima concentração, foram preparadas outras concentrações menores a partir de uma nova solução estoque, no caso de P1 até 0,25 µg/mL (1,5 µmol/mL). Neste estudo foram utilizados como drogas padrões: Anfotericina B e fluconazol.

<sup>143</sup> Giannini, F. A.; Aimar, M. L.; Sortino, M.; Gomez, R.; Sturniollo, A.; Juarez, A.; Zacchino, S.; Rossi, R. H.; Enriz, R. D.; *Il Farmaco*, 2004, 59(4), 245.

<sup>144</sup> Chan, M. M. Y.; *Biochem. Pharmacol.* 2002, 63(2), 99.

### V.3.7- Teste de Atividade Fungicida

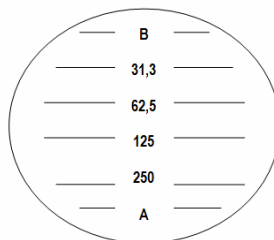
#### V.3.7.a- Preparação das Placas de Petri

Para preparação da placa de petri solubilizou-se 65 g Agar *Sabouraud* Dextrose para 1 L de água deionizada, autoclavou-se tal mistura e transferiu-se (ainda quente) para as placas de Petri.

#### V.3.7.b- Avaliação da Atividade Fungicida

Em uma placa de Petri contendo cultivo de Agar *Sabouraud* Dextrose (Esquema 6) foi feito um subcultivo transferindo 10 µL do composto inoculado em diferentes concentrações a partir da placa de elisa que havia sido avaliada a CIM e, portanto, com atividade inibitória comprovada. Esperou-se uns 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 24h de cultivo.

Os compostos que apresentaram atividade fungicida foram **P6** e **P7**, o primeiro apresentou esta atividade a CFM de 125 µg/mL contra *C. neoformans*, o segundo apresentou atividade fungicida iniciando contra *S. cerevisiae* a CFM de 62 µg/mL onde cerca de 90% das leveduras foram mortas e *C. neoformans* com CFM a 125 µg/mL.



**Esquema 4:** 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).

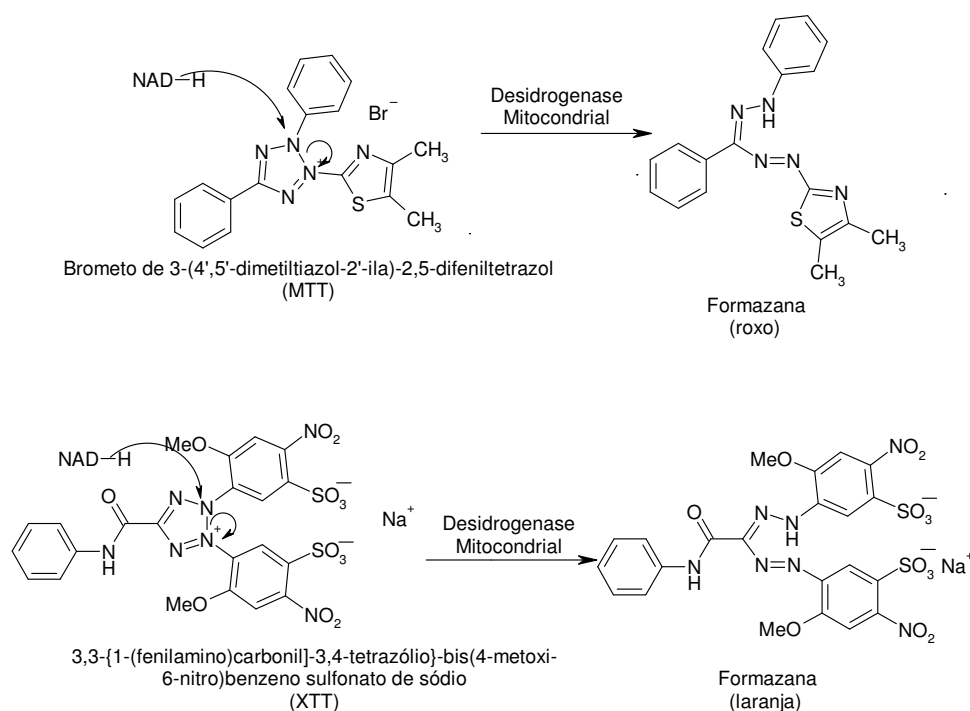
### V.4 - ESTUDOS DA ATIVIDADE ANTITUMORAL - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DE 50% DA POPULAÇÃO CELULAR ( $IC_{50}$ )

Para a medida do crescimento e da viabilidade celular, há três alternativas de ensaios *in vitro*, consideradas pelo NCI (National Câncer Institute).<sup>145</sup> Duas consistem em ensaios de metabolismo celular, onde sais de tetrazólio (MTT e XTT) são reduzidos a produtos coloridos. Nestes ensaios colorimétricos (Figura 89), 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<sup>145</sup>. No entanto a metabolização do XTT produz cristais de formazana, de cor laranja, que são solúveis em água,

<sup>145</sup> Boyd, M. R.; *Principles and Practice of Oncology Updates*, 1989, 3(10), 1. Bellamy, W. T.; *Drugs*, 1992, 44, 690.

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.<sup>146</sup> A absorvância dos produtos formazanas, medida espectrofotometricamente, é diretamente correlacionada com o número de células ativas metabolicamente. Sendo assim, valores de absorvância 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.

O estudo da atividade antitumoral dos compostos **P1** e **P2** contra as linhagens tumorais: adenocarcinoma gástrico humano (AGS), carcinoma de cólon murino (CT26WT), carcinoma mamário humano (MCF-7) e glioma de rato (C6) foi feito em colaboração e sob supervisão da Profa. Dra. Miriam Tereza Paz Lopes -ICB.



**Figura 89:** Redução do MTT e do XTT a formazana.

#### V.4.1 - Meio de Cultura Celular

Para cada 1,0 L de meio tem-se: RPMI 1640 (Sigma Chemical Company) em água deionizada, 1,2 g de bicarbonato de sódio (Grupo Química Indústria Ltda.), 10  $\mu$ M de HEPES pH 7,4 (INLAB), 0,1 g de Ampicilina (Wyeth), 0,1 g de Estreptomicina (Sigma Chemical Company), 0,05 g de Gentamicina (farmácia HC -FMUSP), 0,0025 g de Anfotericina B (Bristol-Myers Squibb). Este

<sup>146</sup> Scudiero, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H.; Currens, M. J.; Seniff, D.; Boyd, M. R.; *Cancer Research*, **1988**, *48*, 4827.

meio foi esterilizado por filtração através de membranas de 0,2  $\mu$  de porosidade (Micro Filtration Systems).

#### V.4.2 - O Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab)

O SFB foi inativado a 56 °C por 30 minutos e esterilizado por filtração através de membranas de 0,2  $\mu$  de porosidade (Micro Filtration Systems).

#### V.4.3 - Os Reagentes Utilizados

Os reagentes utilizados foram Mitomicina (Sigma Chemical Company), Taxol (Sigma Chemical Company), MTT (Brometo de 3-(4', 5'-dimetiltiazol-2'-ila)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma Chemical Company)

#### V.4.4 - Aparelhos

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.

#### V.4.5 - Estudo da Atividade Antitumoral

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 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 % e, 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<sup>148</sup> 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 horas antes das leituras (0,05 mg/cavidade), sendo esse realizado 5 dias após a adição dos compostos, 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.

## VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- 1) Neste trabalho foram sintetizados, por rotas clássicas e de fácil execução, o total de 7 compostos tipo precursores dendriméricos, sendo compostos tipo tioureido funcionalizados (P1-P7), com exceção de P1, todos os outros 6 derivados são inéditos na literatura, cabendo ressaltar que todos os precursores, intermediários e produtos finais foram devidamente caracterizados através das técnicas de caracterização espectroscópica e físico-química usuais;
- 2) De todos os compostos estudados quanto à sua atividade antifúngica, o derivado tris(2-tioureídoetil)amina (P1) mostrou-se como o agente antifúngico mais potente contra *Candida albicans* e *C. glabrata* ( $0.49 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ou  $1,5 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sendo então um promissor agente antifúngico com atividade superior ao fluconazol ( $1,95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ou  $6,37 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ );
- 3) Os derivados P3, o amino-tris-, e P6, tio-éter-funcionalizados com grupo N, N'-dimetiltioureido foram os agentes antifúngicos com maior espectro de ação inibindo todos os microrganismos estudados (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans* e *Saccharomices cerevisae*) com exceção de *C. dubliniensis* e *Candida parapsilosis*;
- 4) A espécie *Candida parapsilosis*, contudo mostrou suscetibilidade somente com os derivados P6 (derivado tipo amina tetrafuncionalizada com grupo N,N-dimetiltioureido) e P7 (derivado sulfeto bis-funcionalizado com grupo N, N'- dimetiltioureido), em concentrações de  $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( ou  $216 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e  $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $776 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ );
- 5) O derivado P5 foi ativo somente contra *C. glabrata* ( $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ou  $447 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), enquanto que o derivado P6 foi ativo contra *C. glabrata*;
- 6) Os derivados P2 e P4 mostraram-se inativos contra todas as espécies de *Candida* testadas, contudo há sugestões para explicação de tal comportamento negativo. Esta inatividade pode ser explicada pela presença de ligações de hidrogênio intra- e inter-moleculares muito fortes (detectadas na observação do espectro na região do IV) que impedem a ação de grupos tioureido livres de exercerem a atividade antifúngica esperada. O uso de DMSO como co-solvente nos testes biológicos pode quebrar tais interações e possível formação de agregados;
- 7) Relações de estrutura-atividade gerais podem ser sugeridas no presente trabalho indicando-se que há a influência de alguns fatores sobre a atividade antifúngica: a presença do grupo tioureido



como possível centro farmacofórico, da ramificação (bis-, tris- ou tetra-substituição) e do grau de metilação dos grupos tioureido. Mais especificamente pode-se relatar que:

**7a)** Para os derivados tipo amina tri-funcionalizada com grupos tioureido (**P1**, **P2** e **P3**) observa-se que o maior grau de metilação parece diminuir a potência antifúngica.

**7b)** Para os derivados tipo amina-tetraureido-substituída (**P4**, **P5** e **P6**) o maior grau de metilação parece acentuar a potência antifúngica.

**7c)** Em uma análise mais global, considerando os resultados anteriores do nosso grupo de pesquisas com derivados bis-funcionalizados (**PA** a **PL**, Tabela 9, p. 66), que podem ser comparados com o nosso derivado sulfeto bis-funcionalizado mas, tetra-metilado **P7**, observa-se perfil de correlação similar aos dos derivados amina-tetra-funcionalizados descritos acima (7b).

**7d)** Pode-se sugerir que nos derivados bis- e tetra-funcionalizados há grande possibilidade de fortes interações tipo ligação de hidrogênio intramoleculares devido à maior simetria molecular e presença de número par de grupos aceptor/doador de ligações de hidrogênio e nos derivados não-alquilados estas interações são mais fortes tornando os grupos farmacofóricos tioureido inacessíveis para a ocorrência da ação antifúngica mesmo com diluição;

**7e)** Nos derivados tipo tri-substituídos o número ímpar de grupos tioureido conduz a possível ocorrência de uma interação intramolecular entre dois dos grupos tioureido e a ocorrência de interação intermolecular com o terceiro grupo. Estas interações intermoleculares são quebradas pela diluição e assim a atividade antifúngica pode ser alcançada em baixos níveis de concentração;

**8)** A espécie *Candida dubliniensis* foi a mais resistente a ação dos nossos compostos, o que não é incomum, pois esta espécie é extrato clínico usualmente mais resistente;

**9)** As espécies *Candida albicans* and *C. glabrata* foram as espécies mais sensíveis aos nossos compostos;

**10)** *Cryptococcus neoformans* foi susceptível a **P1**, **P3**, **P6** e **P7** nas seguintes respectivas concentrações: 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (3095  $\text{nmol.mL}^{-1}$ ), 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (614  $\text{nmol.mL}^{-1}$ ), 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (216  $\text{nmol.mL}^{-1}$ )e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (310  $\text{nmol.mL}^{-1}$ ).

**11)** **P1**, **P6** e **P7** apresentaram atividade inibitória contra *Saccharomice Cerevisae*.

12) Apenas os compostos **P6** e **P7** apresentaram atividade fungicida contra *Cryptococcus neoformans* e contra *Saccharomyces cerevisiae*.

13) O uso da metodologia de RP-HPLC para avaliação da lipofilia e determinação do log P não se mostrou adequada para os compostos sintetizados, provavelmente devido ao fato de que os compostos utilizados na padronização da coluna não eram tão similares estruturalmente aos nossos compostos, que são bem mais ramificados e polifuncionalizados, o que pode conduzir à de agregados (por ligação-H, etc...) que podem alterar o mecanismo de difusão dentro da coluna do HPLC e não permitir a correlação dos dados entre os padrões e os compostos estudados; o uso de outras técnicas, tais como a cromatografia de camada delgada e mesmo “shake-flask” podem ser alternativas para a determinação de log P;

14) Os compostos **P1** e **P2** que foram testados contra as linhagens tumorais: adenocarcinoma gástrico humano (AGS), carcinoma de cólon murino (CT26WT), carcinoma mamário humano (MCF-7) e glioma de rato (C6) mostraram-se ativos somente na concentração da ordem de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup> e pelas convenções atuais não se mostram como agentes antineoplásicos promissores para o tratamento destes tumores.

Finalmente, como perspectivas futuras deste trabalho têm-se o estudo de novos derivados similares tipo tioureido e/ou amidínicos com outras estruturas que forneçam maior lipofilia e maior rigidez, o que será efetuado com a introdução de unidades aromáticas e heteroaromáticas. Além disso, será efetuado o estudo de atividade anti-leucêmica de todos os compostos.

Para termos um melhor entendimento do mecanismo de ação biológica dos compostos estudados far-se-ão colaborações científicas com grupos de pesquisa do ICB-UFMG e IQ-USP-São Carlos. Adicionalmente, tentar-se-á também verificar a possibilidade do estudo da interação enzima-substrato com enzimas tipo aspartase de *Candida spp.* com os nossos substratos e em estudo avançado tentar-se-á verificar tal interação por espectrometria de massas.