

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**Desenvolvimento de pró-fármacos do ácido pirazinóico
activados por esterases de micobactérias**

Teresa Sofia Baptista de Almeida

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2011

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



Desenvolvimento de pró-fármacos do ácido pirazinóico activados por esterases de micobactérias

Teresa Sofia Baptista de Almeida

Dissertação orientada por:

Professor Doutor Luís Filipe Vicente Constantino

Professora Doutora Emília Alice dos Reis Torroaes Valente

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2011

Desenvolvimento de pró-fármacos do ácido pirazinóico activados por esterases de micobactérias

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica e Terapêutica

O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), sob a orientação do Doutor Luís Filipe Vicente Constantino e co-orientação da Doutora Emília Alice dos Reis Torroaes Valente da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Agradecimentos

Ao meu orientador Doutor Luís Filipe Vicente Constantino pela sua orientação e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À minha co-orientadora Doutora Emília Alice dos Reis Torroaes Valente pelo acompanhamento constante ao longo de todo o trabalho.

Ao grupo do CPM-URIA pelos ensaios de actividade *in vitro*.

Ao professor Doutor Rui Moreira por me ter possibilitado trocar o tema da tese.

Ao Sr. Francisco Carvalho pelo apoio logístico e paciência.

A todos da unidade de Química Medicinal do iMed-UL que directa ou indirectamente tornaram possível a realização deste trabalho, em especial aqueles que estiveram sempre disponíveis para me ajudar no meu trabalho – Alexandre Pinto, Ana Ressureição, Carlos Ribeiro, João Lavrado, João Rosa, Mariana Reis, Marta Carrasco, Rudi Oliveira, Susana Lucas.

Aos meus amigos.

À minha família por todo o apoio.

Ao Gustavo por me ter incentivado a inscrever no Mestrado e por me ter ajudado do início ao fim.

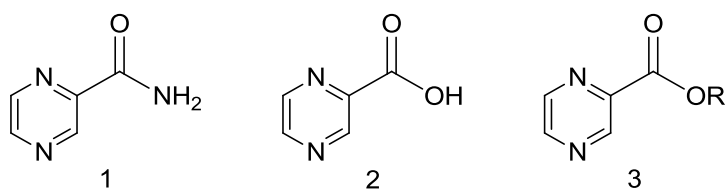
Resumo

A tuberculose continua a ser uma doença infecciosa que afecta milhões de pessoas em todo o mundo. Todos os anos são relatados 10 milhões de novos casos de tuberculose. O agente infeccioso que causa a tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, tem desenvolvido resistências aos fármacos actualmente disponíveis para o tratamento da tuberculose. A pirazinamida (1) é um desses fármacos, sendo na realidade um pró-fármaco do ácido pirazinóico (2). É transformada na sua forma activa pela pirazinamidase, enzima micobacteriana, codificada pelo gene *pncA*. A resistência à pirazinamida está geralmente associada a mutações neste gene.

A síntese de ésteres do ácido pirazinóico (3) como pró-fármacos alternativos à pirazinamida pretende responder ao problema apresentado pela resistência à pirazinamida. Os ésteres sintetizados diferem não só no comprimento da cadeia lateral como nas ramificações ao longo da cadeia. Esta diferença deve-se ao facto de ser necessário que estes derivados do ácido pirazinóico sejam resistentes à hidrólise pelas esterases humanas (principalmente do plasma e fígado) para que cheguem intactos à micobactéria, sendo rapidamente hidrolisados pelas esterases micobacterianas.

A avaliação da estabilidade dos pró-fármacos é, por isso, fundamental. De um modo geral, os ésteres sintetizados demonstraram ser estáveis em plasma.

Relativamente aos estudos de actividade *in vitro*, todos os derivados sintetizados demonstraram actividade contra três espécies de micobactéria (*M. smegmatis*, *M. Bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Ra).



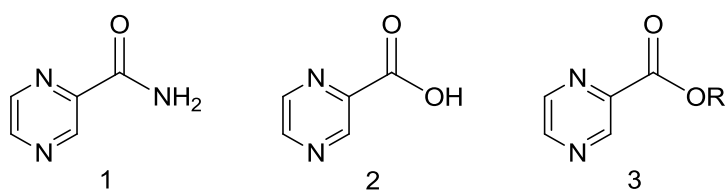
Palavras Chave: Tuberculose, Pirazinamida, Ácido pirazinóico, Pró-fármacos

Abstract

Tuberculosis still remains as one of the most threatening diseases spread around the world with 10 million new cases every year. *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis, is the leading bacterial cause of infectious disease mortality. The development of *M. tuberculosis* strains resistant to all front-line antitubercular drugs has prompted worldwide efforts to develop new antibiotics to treat this pathogen. Pyrazinamide (1), a first line drug in tuberculosis chemotherapy, is itself a prodrug. Mycobacterial pyrazinamidase converts pyrazinamide to pyrazinoic acid (2), the active metabolite. Although pyrazinamidase is codified by *pncA* gene, its mutations lead to enzyme inactivation, and pyrazinamide resistance. In order to overcome this problem other pyrazinoic acid derivatives (3), specifically esters, have been synthesized.

These ester prodrugs with different branched and linear alkyl chains will be converted into the main drug by different mycobacterial esterases. In order to be effective *in vivo*, these compounds must be resistant to hydrolysis by the human enzymes – (eg. plasma and liver esterases) - but should be readily hydrolyzed by the mycobacterial enzymes at the site of action. So far, stability studies in plasma showed positive results.

The synthesized prodrugs presented antimycobacterial activity against different mycobacteria (*M. smegmatis*, *M bovis BCG* and *M. tuberculosis H37Ra*).



Keywords: Tuberculosis, Pyrazinamide, Pyrazinoic acid, Prodrugs

Abreviaturas e simbologia

TB – tuberculose

VIH – vírus da imunodeficiência humana

M. – *Mycobacterium*

MDR-TB – tuberculose multi-resistente

XDR-TB – tuberculose extensivamente resistente

PZA – pirazinamida

ARN – ácido ribonucleico

ADN – ácido desoxirribonucleico

POA – ácido pirazinóico

FAS - I – sintetase de ácidos gordos tipo I

ATP – adenosina trifosfato

RpsA – proteína ribossomal S1

ADEPT – *Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*

GDEPT – *Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy*

VDEPT – *Virus-Directed Enzyme Prodrug Therapy*

Tyr – tirosina

Trp – triptofano

Eq. – equivalentes

h – hora

THF – tetrahidrofurano

TEA – trietilamina

η – rendimento

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

¹H-RMN – espectoscopia de Ressonância Magnética Nuclear de próton

¹³C-RMN – espectoscopia de Ressonância Magnética Nuclear de carbono

I.V. – Infra-vermelho

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

CPM-URIA – Centro de Patogénese Molecular - Unidade dos Retrovírus e Infecções Associadas

min – minuto

s – segundo

Ct – concentração total

I – força iónica

k_{obs} – constante de *pseudo*-primeira ordem

CMI – concentração mínima inibitória

P – coeficiente de partilha

σ* – parâmetro de polaridade de Taft

E_s – parâmetro estereoquímico de Taft

E_s σ – parâmetro estereoquímico de Charton

CCF – Cromatografia em camada fina

Índice

1. Introdução	3
1.1. Tuberculose	3
1.1.1. Epidemiologia	3
1.1.2. Caracterização da doença.....	3
1.1.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
1.1.4. Tratamento actual.....	6
1.1.5. Pirazinamida	8
1.2. Pró-fármacos	11
1.2.1. Ésteres usados no desenvolvimento de pró-fármacos.....	13
1.2.2. Hidrólise química.....	14
1.2.3. Hidrólise enzimática.....	14
1.2.4. Esterases	15
1.2.5. Esterases no plasma humano.....	16
1.2.6. Esterases de micobactérias	18
1.3. Pró-fármacos do ácido pirazinóico	18
1.4. Objectivo do trabalho	20
2. Síntese e identificação estrutural	23
2.1. Síntese dos ésteres derivados do ácido pirazinóico	23
2.1.1. Síntese do cloreto do ácido pirazinóico	23
2.1.2. Síntese dos ésteres derivados do ácido pirazinóico	24
2.1.3. Ésteres do ácido pirazinóico sintetizados.....	25
2.1.3.1. Ésteres de cadeia alquílica linear	25
2.1.3.2. Ésteres com uma ramificação no carbono adjacente à função éster	26
2.1.3.3. Ésteres com duas ramificações no carbono adjacente à função éster	27
2.1.3.4. Ésteres com uma ramificação no segundo ou terceiro carbono da cadeia alquílica	28
2.1.3.5. Pirazinoato de 4-clorobutilo	29
2.1.3.6. Ésteres com grupos laterais aromáticos ou cíclicos adjacentes à função éster	29
2.2. Identificação estrutural dos compostos sintetizados	30
2.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	30
2.2.2. Espectroscopia de infra-vermelho	31
2.2.3. Espectrometria de massa	31
3.1. Estudo da estabilidade em tampão fosfato	35

3.2.	Estabilidade em plasma humano.....	38
3.3.	Razão estabilidade plasma/estabilidade tampão fosfato pH 7.4.....	40
3.4.	Estudos de actividade <i>in vitro</i>	40
4.	Relações estrutura-actividade	45
4.1.	Efeito do comprimento da cadeia alquílica	45
4.2.	Efeito da lipofilia do derivado.....	47
4.3.	Efeito da Polaridade.....	51
4.4.	Efeito da estereoquímica da cadeia alquílica	52
4.5.	Correlações entre estabilidade, actividade e os diversos descritores moleculares	55
4.6.	Estabilidade em plasma humano e actividade	57
5.	Conclusão	61
6.	Procedimento experimental.....	65
6.1.	Equipamento e material	65
6.2.	Reagentes e solventes	66
6.3.	Síntese de derivados do ácido pirazinóico	66
6.3.1.	Pirazinoato de pentilo (4a).....	66
6.3.2.	Pirazinoato de hexilo (4b).....	67
6.3.3.	Pirazinoato de heptilo (4c).....	68
6.3.4.	Pirazinoato de octilo (4d).....	68
6.3.5.	Pirazinoato de nonilo (4e).....	69
6.3.6.	Pirazinoato de decilo (4f).....	70
6.3.7.	Pirazinoato de undecilo (4g).....	71
6.3.8.	Pirazinoato de isopropilo (5a).....	71
6.3.9.	Pirazinoato de sec-Butilo (5b).....	72
6.3.9.1.	Síntese de pirazinoato de sec-butilo via método A	72
6.3.9.2.	Síntese de pirazinoato de sec-butilo via método B	73
6.3.10.	Pirazinoato de 1-metil-hexilo (5c).....	73
6.3.11.	Pirazinoato de <i>R</i> -(-)-1-metil-hexilo (5d).....	74
6.3.12.	Pirazinoato de <i>S</i> -(+)-1-metil-hexilo (5e).....	75
6.3.13.	Pirazinoato de 1-metil-heptilo (5f).....	76
6.3.14.	Pirazinoato de 1-metil-octilo (5g)	76
6.3.15.	Pirazinoato de 1-metil-nonilo (5h).....	77
6.3.16.	Pirazinoato de 1-metil-undecilo (5i)	78

6.3.17.	Pirazinoato de <i>terc</i> -butilo (6a)	79
6.3.17.1.	Síntese de pirazinoato de <i>terc</i> -butilo via método B.....	79
6.3.17.2.	Tentativa de síntese de pirazinoato de <i>terc</i> -butilo via tricloroacetimidato.....	79
6.3.18.	Pirazinoato de 1,1-dimetilpropilo (6b)	80
6.3.19.	Pirazinoato de 1,1-dimetilbutilo (6c).....	80
6.3.20.	Pirazinoato de 1,1-dimetilpentilo (6d).....	81
6.3.21.	Pirazinoato de 1,1-dimetil-hexilo (6e).....	82
6.3.22.	Pirazinoato de isobutilo (7a).....	83
6.3.23.	Pirazinoato de 2-metilbutilo (7b)	83
6.3.24.	Pirazinoato de isopentilo (8a).....	84
6.3.25.	Pirazinoato de 4-clorobutilo (9a).....	85
6.3.26.	Pirazinoato de fenilo (10a).....	85
6.3.27.	Pirazinoato de ciclo-hexilo (10b).....	86
6.3.28.	Pirazinoato de 1-metilciclo-hexilo (10c).....	87
6.4.	Estudos de estabilidade dos ésteres do ácido pirazinóico	88
6.4.1.	Estudos de estabilidade em tampão fosfato	88
6.4.2.	Estudos de estabilidade em plasma humano	89
7.	Referências Bibliográficas	93
APÊNDICE I		xv
APÊNDICE II		xvi
ANEXO I		xix
ANEXO II		xx
ANEXO III		xxi

Índice de Figuras

Figura 1 – Taxas de incidência de tuberculose estimadas, por país, em 2009	3
Figura 2 – Fármacos actualmente usados como tratamento padrão da tuberculose	7
Figura 3 – Derivados da nicotinamida usados no tratamento da tuberculose	8
Figura 4 – Esquema do mecanismo de acção proposto para a pirazinamida	9
Figura 5 – Pirazinamida e os seus derivados metabólicos	11
Figura 6 – Esquema geral da hidrólise química de derivados de ácidos carboxílicos	14
Figura 7 – Grupos catalíticos comuns na hidrólise de derivados de ácidos carboxílicos	15
Figura 8 – Reacção geral de síntese de um éster derivado do ácido pirazinóico	23
Figura 9 – Mecanismo da reacção de esterificação usando como base a trietilamina	23
Figura 10 – Esquema da reacção de síntese do cloreto do ácido pirazinóico	24
Figura 11 – Mecanismo da reacção de síntese de um cloreto de ácido usando cloreto de tionilo	24
Figura 12 – Esquema da reacção de síntese usada no método A	25
Figura 13 – Esquema da reacção de síntese usada no método B	26
Figura 14 – Mecanismo da reacção do ácido pirazinóico com o 2,2,2-tricloroacetimidato de <i>tert</i> -butilo	28
Figura 15 – Variação da percentagem de éster e da percentagem de ácido ao longo tempo para o composto pirazinoato de hexilo (4b)	36
Figura 16 – Variação da percentagem de éster e da percentagem de ácido ao longo tempo para o composto pirazinoato de <i>sec</i> -butilo (5b)	36
Figura 17 – Variação da percentagem de éster e da percentagem de ácido ao longo tempo para o composto pirazinoato de <i>tert</i> -butilo (6a)	37
Figura 18 – Variação da percentagem de éster e da percentagem de ácido ao longo tempo para o composto pirazinoato de 1-metilundecilo (5i)	39
Figura 19 – Relação entre o comprimento da cadeia lateral e o valor de k_{obs} (plasma)	45
Figura 20 – Relação entre o comprimento da cadeia e o valor de $pCMI$ para <i>M. tuberculosis</i> H37Ra	46
Figura 21 – Relação entre o comprimento da cadeia de derivados com uma ramificação no primeiro carbono da cadeia lateral e o valor de $pCMI$ para <i>M. tuberculosis</i> H37Ra	47
Figura 22 – Relação entre a lipofilia e o valor de k_{obs} (plasma)	49
Figura 23 – Relação entre a lipofilia e o valor de $pCMI$ para <i>M. tuberculosis</i> H37Ra	50
Figura 24 – Relação entre lipofilia de derivados com uma ramificação no primeiro carbono da cadeia lateral e o valor de $pCMI$ para <i>M. tuberculosis</i> H37Ra	50
Figura 25 – Relação entre parâmetro de polaridade de Taft (σ^*) e actividade <i>in vitro</i> contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra	52
Figura 26 – Relação entre parâmetro de Charton ($E_s \nu$) e actividade <i>in vitro</i> contra <i>M. tuberculosis</i> H37Ra	54

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Fármacos usados no tratamento da tuberculose	7
Tabela 2 – Barreiras que o desenvolvimento de pró-fármacos pretende ultrapassar	11
Tabela 3 – Classificação das esterases do <i>Enzyme Nomenclature Committee</i> e respectivo número de Comissão	16
Tabela 4 – Ésteres do ácido pirazinóico com cadeias alquílicas lineares	25
Tabela 5 – Ésteres do ácido pirazinóico com cadeias alquílicas com uma ramificação no primeiro carbono	26
Tabela 6 – Ésteres do ácido pirazinóico com cadeias alquílicas com três ramificações no primeiro carbono	27
Tabela 7 – Ésteres do ácido pirazinóico com cadeias alquílicas com uma ramificação no segundo carbono	28
Tabela 8 – Pirazinoato de isopentilo	29
Tabela 9 – Pirazinoato de 4-clorobutilo	29
Tabela 10 – Ésteres do ácido pirazinóico grupos laterais cíclicos ou aromáticos	30
Tabela 11 – Hidrólise dos ésteres derivados do ácido pirazinóico em tampão fosfato pH=7.4	35
Tabela 12 - Hidrólise dos ésteres derivados do ácido pirazinóico em plasma humano a 80% em tampão fosfato pH=7.4	38
Tabela 13 – Razão entre k_{obs}/h^{-1} da hidrólise em plasma e k_{obs}/h^{-1} da hidrólise em tampão fosfato pH 7.4	40
Tabela 14 – Resultados dos estudos de actividade <i>in vitro</i> para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra	41
Tabela 15 – Valores de log P calculados para todos os derivados sintetizados	48
Tabela 16 – Valores do parâmetro de polaridade de Taft para os derivados sintetizados	51
Tabela 17 – Valores do parâmetro estereoquímico de Charton para os derivados sintetizados	53
Tabela 18 – Estabilidade em plasma e a concentrações mínimas inibitórias dos compostos mais activos para <i>M. tuberculosis</i> H37Ra	57
Tabela 19 – Estabilidade em plasma e a concentrações mínimas inibitórias obtidas para <i>M. tuberculosis</i> H37Ra dos compostos mais estáveis em plasma	58

I – Introdução Teórica

1. Introdução

1.1. Tuberculose

1.1.1. Epidemiologia

A tuberculose (TB) é a segunda maior causa de morte em todo o mundo causada por um único agente infeccioso, logo a seguir ao vírus da imunodeficiência humana (VIH) (1). Estima-se que em 2009, 1.7 milhões de pessoas tenham morrido de TB, o que equivale a 4700 mortes por dia (2). A sua taxa de incidência, apesar do declínio observado desde 1990, continua a ser bastante elevada (2). Em 2009, ocorreram 9.4 milhões novos casos de TB, dos quais 1.1 milhões foram registados em pacientes infectados também com VIH (2). A incidência de TB em 2009 era equivalente a 137 novos casos por 100000 pessoas – **Figura 1 (2)**.

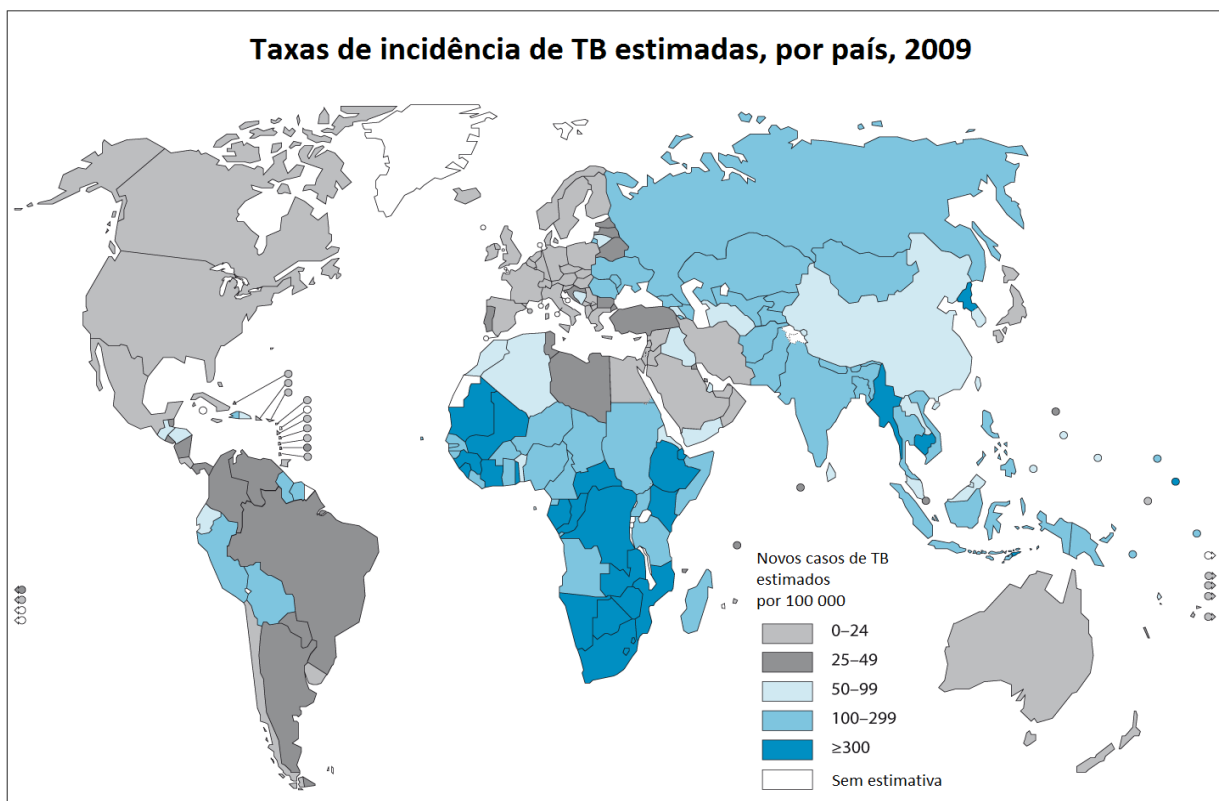


Figura 1 – Taxas de incidência de tuberculose estimadas, por país, em 2009 (2).

1.1.2. Caracterização da doença

A tuberculose é uma doença transmissível. A infecção é iniciada pela inalação de pequenos núcleos (1-5 μm diâmetro) contendo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), expectorado por pacientes com a doença activa. (1, 3). Devido à sua pequena dimensão, os

núcleos inalados evitam as defesas dos brônquios, penetrando nos alvéolos pulmonares, onde são fagocitados por células apresentadoras de antígenos, como os macrófagos alveolares, e as células dendríticas (1, 3, 4). Nos pulmões, o *M. tuberculosis* pode ainda infectar outros tipos de células não fagocíticas como as células endoteliais (3). Na fase inicial da infecção, o *M. tuberculosis* interiorizado pelos macrófagos e pelas células dendríticas, replica-se intracelularmente e as células do sistema imunitário, infectadas com *M. tuberculosis*, podem atravessar a barreira alveolar e disseminar-se a nível sistémico, atingindo diversos órgãos e tecidos como fígado, baço, rins, osso, cérebro, meninges e outras zonas dos pulmões que não os alvéolos (3, 4).

O padrão típico da doença tem sido descrito em quatro fases. A primeira consiste na implantação das bactérias inaladas nos alvéolos, que ocorre 3 a 8 semanas após a inalação seguindo-se a disseminação através da circulação linfática para os nódulos linfáticos nos pulmões, formando o complexo primário (5). Na segunda fase, conhecida como doença primária que ocorre aproximadamente nos 3 meses seguintes, a bactéria circula através da corrente sanguínea para outros órgãos, podendo culminar na morte do doente. A terceira fase pode ocorrer em qualquer altura após dois anos de infecção, e é tipicamente marcada pela inflamação da pleura e dor severa no peito. A fase final consiste na resolução do complexo primário e pode levar diversos anos. Em alguns casos a doença extrapulmonar pode manifestar-se neste período (1).

A procura de novos fármacos para a tuberculose estagnou nos anos 80. Houve a errada percepção de que o problema da tuberculose estava controlado sendo apenas necessário aplicar as estratégias desenvolvidas até à data. Contudo, a combinação da falha humana (má adesão ao tratamento) e a infalibilidade microbiana (aparecimento de resistência quando a terapêutica não estava assegurada) conduziu a surtos de tuberculose multi-resistente (MDR-TB), na década de 90. A resistência na TB é um problema quase exclusivamente provocado pela acção humana, causada por prescrições não apropriadas, má adesão à terapia, fornecimento irregular de fármacos e/ou má eficácia dos fármacos (5). Actualmente, estima-se que 5% dos cerca de 9 milhões de pessoas que desenvolvem TB em todo o mundo anualmente estejam infectadas por uma estirpe multi-resistente. Uma estirpe multi-resistente para ser considerada como tal, deve ser resistente a, pelo menos, dois dos fármacos anti-TB mais potentes que estão presentemente disponíveis, a isoniazida e rifampicina (6, 7). A pandemia global do VIH conduziu a um enorme aumento da incidência da TB (8). O tratamento simultâneo do VIH e TB pode conduzir a uma má absorção de rifampicina e isoniazida. Os consequentes níveis terapêuticos abaixo do desejável podem

levar ao desenvolvimento de MDR-TB (9). Estima-se que, em 2008, 1.4 milhões (15%) dos pacientes com TB estavam coinfectados com VIH (3).

Em 2006, foi descrita pela primeira vez a tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB). Por definição, a XDR-TB é um tipo de MDR-TB que também é resistente a, pelo menos, uma das fluoroquinolonas e a um dos fármacos injectáveis de segunda linha como a amicacina, canamicina e capreomicina (7).

Assim, com o desenvolvimento de resistências, a procura de novos fármacos para a tuberculose está a reemergir. Actualmente, estão a ser estudadas novas formas de usar os fármacos já existentes, de forma a melhorar o tratamento, assim como a identificação de novas classes de fármacos (8).

1.1.3. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium é um género de bacilo ácido-álcool resistente (4). São aeróbios obrigatórios e não formam esporos. Os ácidos micólicos, presentes na sua parede celular, são responsáveis pela sua denominação (mico). Estes ácidos micólicos são ácidos gordos de cadeia longa e são distintos entre espécies, sendo que os lípidos representam mais de 60% da massa total da célula (4, 10).

A sua classificação científica é:

Reino: Bacteria

Filo: Actinobacteria

Classe: Actinobacteria

Sub-classe: Actinobacteridae

Ordem: Actinomycetales

Sub-ordem: Corynebacterineae

Família: Mycobacteriaceae

Género: *Mycobacterium* (11)

Os membros mais patogénicos deste género são o *M. tuberculosis*, responsável pela tuberculose, o *M. leprae*, responsável pela lepra e o *M. ulcerans*, responsável pela úlcera de Buruli, uma infecção da pele associada a necrose (1). O genoma do *M. tuberculosis* apresenta similaridade superior a 99.9% com o *M. bovis*, espécie que primariamente infecta gado mas também pode causar tuberculose noutros mamíferos, incluindo o homem (3).

As principais características do *M. tuberculosis* são crescimento lento, dormência, e envelope celular complexo (12). O tempo de geração do *M. tuberculosis* em meio sintético ou em animais infectados é, aproximadamente, 24 horas. O estado de dormência, em que o bacilo permanece inactivo no tecido infectado, caracteriza-se por uma inactivação metabólica, resultante da acção de uma resposta imune mediada por células que conseguem conter, mas não erradicar a infecção (12). Ao contrário da maioria dos agentes patogénicos bacterianos, o *M. tuberculosis* institui uma infecção persistente, sendo resistente ao sistema imunitário do hospedeiro. A estratégia usada pelo sistema imunitário do hospedeiro para prevenir o crescimento da infecção consiste na formação de granulomas, agregados de células do sistema imunitário em torno de focos e tecidos infectados (10, 12). Deste modo, o *M. tuberculosis* fica em estado de dormência, provavelmente devido ao stress exercido pela resposta imune do hospedeiro. A micobactéria pode sobreviver neste estado de dormência durante décadas (10). Quando o sistema imunitário se apresentar fragilizado, as bactérias em estado de dormência podem ser reactivadas, causando um surto de doença, por vezes décadas após a infecção inicial (10, 12). O envelope celular possui uma camada adicional a seguir à camada de peptidoglicano, excepcionalmente rica em lípidos pouco vulgares, glicolípidos e polissacáridos (12). O *M. tuberculosis* possui vias biossintéticas para a produção de um vasto número de moléculas lipofílicas componentes da parede celular como os ácidos micólicos (12), sendo o metabolismo lipídico considerado uma das principais vias metabólicas das micobactérias (13).

Os factores de virulência do *M. tuberculosis* não são totalmente conhecidos. Sabe-se que os componentes da parede celular permitem a inclusão do agente infeccioso no macrófago. Uma vez no interior do macrófago, múltiplos factores podem contribuir para a sobrevivência e multiplicação contínua. Já foram identificados alguns genes relacionados com a virulência que melhoram a sobrevivência no interior do macrófago ou influenciam as condições físico-químicas presentes no fagossoma (4). Por exemplo, o *M. tuberculosis* consegue bloquear a maturação dos fagossomas, evitando a sua fusão com os lisossomas, escapando assim à acção imunitária por parte do macrófago (14).

1.1.4. Tratamento actual

Actualmente a TB é tratada usando uma combinação de medicamentos que consiste em três ou mais fármacos (quatro na maioria dos casos) (1). O uso de fármacos como a rifampicina e a pirazinamida (PZA) permitiram a redução dos períodos de tratamento de 18 para 6 meses (1, 15).

O tratamento padrão para a TB consiste em 2 meses de tratamento intensivo com isoniazida, etambutol, rifampicina e PZA, seguido por 4 meses de tratamento de manutenção com isoniazida e rifampicina – **Figura 2** (1, 16, 17).

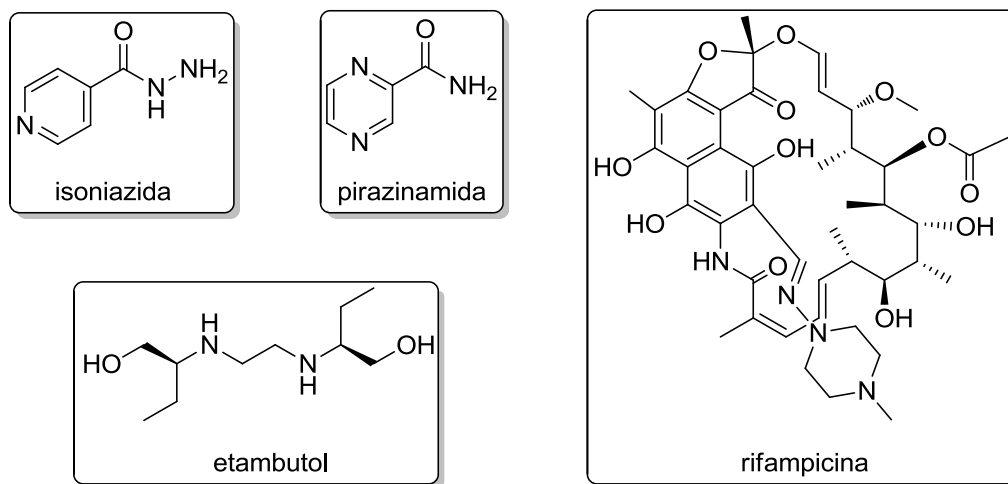


Figura 2 – Fármacos actualmente usados como tratamento padrão da tuberculose.

A isoniazida, um inibidor da síntese da parede celular, mata rapidamente as bactérias em crescimento activo e desempenha um papel fundamental na erradicação da população bacteriana em replicação (1). O etambutol também actua na síntese de componentes para a parede celular (4). A rifampicina, inibidor da síntese de ácido ribonucleico (ARN), não é activa apenas contra a população em replicação mas também contra a que não está em replicação. A PZA, cujo mecanismo de acção não é totalmente claro, apenas parece ser activa em pH ácido durante os dois primeiros meses de tratamento (1).

Os fármacos de primeira linha são bactericidas, à excepção do etambutol, altamente eficazes e menos tóxicos. Os fármacos de segunda linha são, na sua maioria, bacteriostáticos, menos eficazes, mais dispendiosos e têm mais efeitos adversos associados. Estes incluem aminoglicosídeos, polipéptidos, tioamidas, várias fluoroquinolonas, ácido *para*-amino salicílico e D-cicloserina – **Tabela 1** (9).

Tabela 1 – Fármacos usados no tratamento da tuberculose (9).

Fármaco	Via	Classe	Modo de acção	Processo biológico inibido
INH	Oral	1ª linha	Bactericida	Síntese dos ácidos micólicos
RIF	Oral	1ª linha	Bactericida	Síntese de proteínas
PZA	Oral	1ª linha	Bactericida	Mal definido
BEM	Oral	1ª linha	Bacteriostático	Síntese de lípidos/parede celular
RBU	Oral	2ª linha	Bactericida	Síntese de proteínas
SM	Injectável	2ª linha	Bactericida	Síntese de proteínas

Fármaco	Via	Classe	Modo de acção	Processo biológico inibido
CAN/AMI	Injectável	2ª linha	Bactericida	Síntese de proteínas
CAP/VIO	Injectável	2ª linha	Bactericida	Síntese de proteínas
CIP/OFX	Oral	2ª linha	Bacteriostático	Replicação de ADN
LFX	Oral	2ª linha	Provavelmente bactericida	Replicação de ADN
MFX/GFX	Oral	2ª linha	Bactericida	Replicação de ADN
ETH/PTH	Oral	2ª linha	Bacteriostático	Síntese de ácidos micólicos
APAS	Oral	2ª linha	Bacteriostático	Desconhecido
CS	Oral	2ª linha	Bacteriostático	Síntese da parede celular
TAC	Oral	2ª linha	Bacteriostático	Síntese de ácidos micólicos
CLR	Oral	3º linha	Bactericida	Síntese de proteínas
AMX+ACL	Oral	3º linha	Bactericida	Síntese da parede celular
CFZ	Oral	3º linha	Bacteriostático	Função da membrana celular
LZD	Oral	3º linha	Bactericida	Síntese de proteínas

INH, isoniazida; **RIF**, rifampicina; **PZA**, pirazinamida; **EMB**, etambutol; **RBU**, rifabutina; **SM**, streptomina; **CAN**, canamicina; **AMI**, amicacina; **CAP**, capreomicina; **VIO**, viomicina; **CIP**, ciprofloxacina; **OFX**, ofloxacina; **LFX**, levofloxacina; **MFX**, moxifloxacina; **GFX**, gatifloxacina; **ETH**, etionamida; **PTH**, prototionamida; **APAS**, ácido *para*-amino salicílico; **CS**, D-cicloserina; **TAC**, tiacetazona; **CLR**, claritromicina; **AMX+ACL**, amoxicillina + ácido clavulânico; **CFZ**, clofazimina; **LZD**, linezolida.

1.1.5. Pirazinamida

Após ter sido demonstrado que a nicotinamida tratava eficazmente a TB em ratos, sintetizaram-se vários análogos, entre os quais a PZA (18). A PZA, apesar de apresentar actividade *in vivo*, não tinha actividade *in vitro* e o seu uso subsequente no tratamento da TB deve-se, em grande parte, a estudos que mostravam a necessidade de um pH ácido para que a PZA manifestasse actividade (19). É de salientar que a descoberta da PZA, como fármaco se deve, em parte, ao facto de após a síntese terem sido imediatamente iniciados testes *in vivo* sem passar pela triagem, que hoje é normalmente seguida, dos ensaios *in vitro* (19). De referir que os estudos com análogos da nicotinamida conduziram também a outros fármacos para o tratamento da TB, como é o caso da isoniazida e da etionamida -

Figura 3.

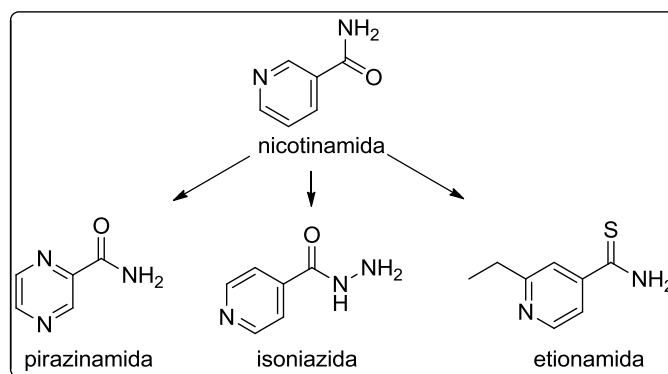


Figura 3 – Derivados da nicotinamida usados no tratamento da tuberculose.

O seu mecanismo de acção é o que se encontra menos compreendido de todos os fármacos anti-TB (19, 20). A PZA é um pró-fármaco que é convertido na sua forma activa, ácido pirazinóico (POA), pela pirazinamidase (1, 19-21). Quando o POA se encontra no citoplasma (pH neutro) está na sua forma de anião, não possuindo actividade antimicobacteriana (19). O anião sai da célula por difusão passiva e por um mecanismo de efluxo pouco eficiente (19, 20). Se o pH extracelular for ácido o anião é convertido na sua forma protonada, que não apresentando carga, entra na célula (19, 20). O influxo de POA protonado é, aparentemente, mais forte do que o efluxo deficiente, havendo uma acumulação de POA protonado dentro da célula (19-22). O POA protonado causa acidificação citoplasmática e consequente inibição de enzimas e processos metabólicos vitais – **Figura 4** (19-22). Além disso, pode haver uma quebra do potencial de membrana, afectando o transporte através da membrana. A pH neutro ou alcalino, existe pouco POA protonado dentro da célula, porque mais de 99.9% está na sua forma de anião o que não permite a sua entrada na célula (19, 20).

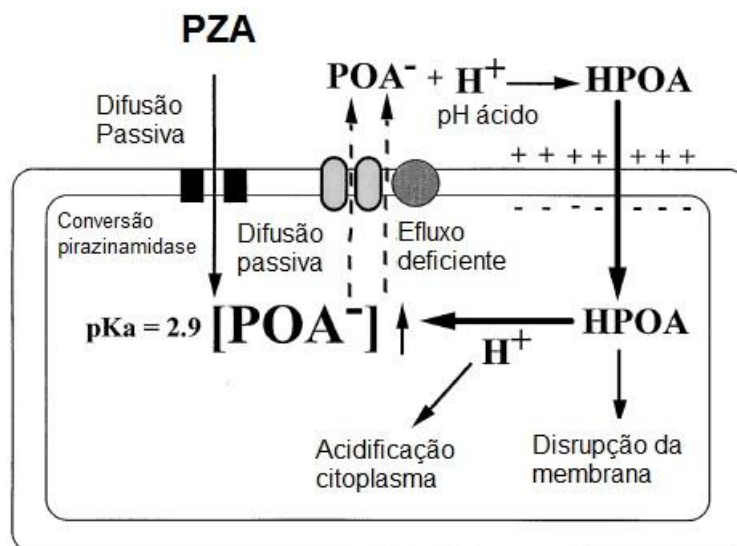


Figura 4 – Esquema do mecanismo de acção proposto para a pirazinamida (19).

A não especificidade do mecanismo proposto ajuda a explicar a maior actividade da PZA contra bacilos em estado de não replicação. Fármacos que se ligam a locais específicos interrompendo vias metabólicas específicas e vitais são sempre mais activos contra bacilos em replicação do que contra bacilos em estado de dormência. O HPOA é excretado através da bomba de efluxo, o que requer energia. Como o metabolismo bacteriano diminui em condições de latência, menos energia estará disponível, levando à acumulação do POA mesmo na célula em estado de latência (22). Assim, a PZA é o único fármaco actualmente disponível para o tratamento da TB que elimina, de forma mais eficiente, organismos em fase de latência do que quando se encontram activos (6, 19-22).

A PZA é apenas activa contra as espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis*, como é o caso do *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. microti* à excepção do *M. bovis* (19). Esta maior susceptibilidade a este fármaco e outros ácidos fracos quando comparado com outras espécies de micobactéria deve-se, presumivelmente, ao efluxo deficiente, à baixa capacidade de manter o potencial de membrana e à acção da pirazinamidase (18, 21, 23, 24).

A inibição da enzima sintetase de ácidos gordos tipo I (FAS-I) é outro mecanismo proposto para a acção da pirazinamida e seus análogos (25). Este mecanismo ainda é controverso, não estando completamente aceite pela comunidade científica. Um estudo, em que se avaliou a actividade da 5-cloropirazinamida em *M. smegmatis* (espécie não susceptível à PZA), propôs que o alvo da PZA seria a FAS-I. Contudo, não foram observadas mutações na FAS-I em estirpes de *M. tuberculosis* resistentes à PZA. Um estudo posterior demonstrou que a FAS-I é o alvo da 5-cloropirazinamida, mas não da PZA ou do POA. Porém, o estudo realizado por Sayahi *et al.* (24), em 2011, demonstrou que tanto a PZA como o POA se ligam a esta enzima, contudo em sítios diferentes. Novos estudos terão de ser feitos de modo a concluir se a FAS-I é ou não um alvo terapêutico da PZA.

Tem-se observado que a susceptibilidade de uma determinada estirpe à PZA está directamente relacionada com a actividade da pirazinamidase (16, 21). O gene *pncA* contém a informação para esta enzima e a perda de actividade da pirazinamidase tem sido correlacionada com mutações neste gene (17). Assim, tem sido considerado que mutações no gene *pncA* são o mecanismo principal de resistência à PZA no *M. tuberculosis* (26, 27). Contudo, já foram descritas estirpes resistentes contendo o gene sem mutação, sugerindo outros mecanismos de resistência (6, 17, 26). A análise de várias espécies micobacterianas que diferem na actividade da pirazinamidase parece ter revelado um segundo mecanismo de resistência. Uma vez que a pirazinamidase não está na superfície da micobactéria, implica que a PZA tem de entrar na célula antes de ser convertida em POA (28). O mecanismo de entrada da PZA dentro do *M. tuberculosis* é controverso. Alguns autores defendem que entra por transporte passivo, enquanto outros defendem um transporte dependente de adenosina trifosfato (ATP). Há ainda a possibilidade de que ambos possam ocorrer (19). Como a entrada na célula pode envolver um sistema de transporte, uma mutação poderá impedir a penetração e activação do fármaco na célula. Assim, parece que a susceptibilidade à PZA dependerá de uma pirazinamidase funcional e de um sistema de transporte da PZA (28). Um estudo recente apresentou uma outra justificação para que estirpes sem mutações no gene *pncA* sejam resistentes à PZA, tendo identificado um novo alvo para POA, a proteína ribossomal S1 (RpsA). Esta proteína é vital para o *M. tuberculosis*

estando envolvida na tradução de proteínas. Verificou-se que o POA se liga a esta proteína, inibindo-a e que algumas estirpes resistentes à PZA que não tinham mutação no gene *pncA* demonstravam mutações a nível da RpsA (29).

Relativamente ao comportamento *in vivo* da PZA, em humanos e ratos, o metabolismo deste composto envolve a desamidação originando POA. Contudo, a oxidação do anel é outra via de metabolização que leva à formação de 5-hidroxipirazinamida, que por sua vez é hidrolisada em ácido 5-hidroxipirazinóico – **Figura 5**. As taxas de hidrólise parecem determinar o tempo de semi-vida da pirazinamida (28).

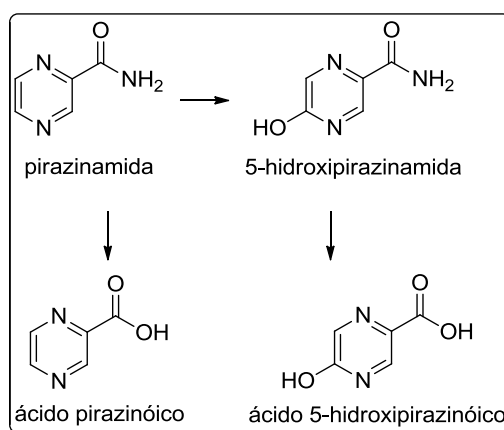


Figura 5 – Pirazinamida e os seus derivados metabólicos (28).

1.2. Pró-fármacos

Pró-fármacos podem ser definidos como agentes terapêuticos que são inativos *per se* mas são transformados nos seus metabolitos activos, de uma forma previsível (28). O objectivo da concepção e desenvolvimento de pró-fármacos é ultrapassar barreiras (**Tabela 2**) de modo a tornar o fármaco activo no seu local de acção. Assim, a conversão do pró-fármaco no local de acção é fundamental para o sucesso do pró-fármaco (30).

Tabela 2 – Barreiras que o desenvolvimento de pró-fármacos pretende ultrapassar (28, 31)

Farmacêuticas	Estabilidade química Baixa solubilidade Sabor ou odor repulsivos
Farmacocinéticas	Baixa absorção oral Efeito de primeira passagem marcado Duração de acção curta Má distribuição corporal
Farmacodinâmicas	Toxicidade

O desenvolvimento de pró-fármacos tem como principais objectivos, obter uma melhor formulação (por exemplo aumento da hidrofília), melhor estabilidade química, melhor aceitação e adesão por parte dos pacientes, melhor biodisponibilidade, uma duração de acção mais prolongada, melhor selectividade dos órgãos e tecidos alvo e conseqüentemente menos efeitos laterais. O desenvolvimento de pró-fármacos pode estar relacionado ainda com questões de *marketing* (obtenção de novos derivados e de novas patentes) (28, 31).

Os pró-fármacos podem ser classificados de várias formas, de acordo com a sua classificação química, mecanismos de activação, mecanismos de selectividade órgão/tecido, potencial tóxico e potencial ganho terapêutico. No âmbito deste trabalho apenas se irá abordar a classificação química uma vez que esta é a mais comum. Deste modo, os pró-fármacos podem ser classificados como:

Pró-fármacos clássicos: estão ligados a um transportador de modo a melhorar algumas propriedades terapêuticas, tais como, biodisponibilidade, selectividade, redução da toxicidade e prolongamento da acção. O transportador está geralmente ligado a um grupo hidroxilo, amina ou carboxilo. A função éster, por exemplo, é muito usada em termos de aumento da lipofília, uma vez que um grupo carboxilo, altamente polar, pode ser mascarado usando esta função.

Bioprecursores: não possuem grupo transportador, sendo activados pela formação metabólica de um grupo funcional. É o caso de agentes quimioterapêuticos cuja activação ocorre pela redução em células com baixo teor de oxigénio. Este tipo de pró-fármacos evita os problemas de toxicidade relacionados com o transportador. Contudo, é necessário salientar potenciais problemas de toxicidade provenientes de intermediários metabólicos.

Sistemas químicos ligados ao local de acção: os pró-fármacos são metabolizados por enzimas específicas do órgão ou local de acção.

Pró-fármacos macromoleculares: conjugados fármaco-macromolécula ligados directamente ou via um grupo de ligação molecular (*spacer*). As macromoléculas podem ser proteínas, polipéptidos, polissacáridos, e polímeros biodegradáveis.

Conjugados fármaco-anticorpo: ADEPT (*Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy*). Esta abordagem envolve uma enzima não existente no organismo acoplada com um anticorpo monoclonal, de modo a activar o pró-fármaco que é selectivamente activado pela enzima. Administra-se o conjugado anticorpo-enzima e ocorre a interacção antigénio-anticorpo. Depois é administrado o pró-fármaco e a enzima do complexo enzima-anticorpo-antigénio

cliva a ligação fármaco transportador, libertando o fármaco. Mais recentemente apareceram o GDEPT (*Gene-directed enzyme prodrug therapy*) e o VDEPT (*Virus-directed enzyme prodrug therapy*) (28, 31).

Existem também pró-fármacos mútuos, que em contraste com os pró-fármacos clássicos onde os transportadores não demonstram actividade biológica, são compostos por dois ou mais fármacos onde um é transportador do outro. A sua vantagem é a possibilidade de ter actividades terapêuticas diferentes ou similares, obtendo efeito sinérgico ou maior eficácia, respectivamente (31).

1.2.1. Ésteres usados no desenvolvimento de pró-fármacos

Um dos objectivos da concepção e desenvolvimento de novos fármacos é definir uma estrutura química que permita uma absorção eficaz para a corrente sanguínea e seja quimicamente estável para atingir o seu alvo de forma eficiente (32). As propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas de um fármaco são cruciais, influenciando a sua solubilidade, absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Moléculas demasiado polares ou hidrofílicas não atravessam as membranas celulares. Moléculas muito hidrofóbicas acumulam-se em tecidos ricos em gordura, sendo pouco solúveis no sangue (32).

Os pró-fármacos têm demonstrado ser muito úteis para mascarar certos grupos funcionais com características pouco adequadas a nível farmacocinético (32). Moléculas muito polares podem ser tornadas mais lipofílicas mascarando um grupo funcional polar com um grupo alquilo ou acilo. Um grupo álcool ou fenol pode ser convertido num éter ou éster e um grupo ácido carboxílico pode ser convertido num éster ou amida (32). Por exemplo o grupo carboxilo desempenha um papel importante na ligação da molécula ao seu alvo uma vez que permite ligações iónicas e ligações de hidrogénio contudo encontra-se na forma ionizada a pH fisiológico, contribuindo significativamente para reduzir a lipofilia de compostos contendo este grupo (28, 32). Como resultado, compostos com grupos carboxilo farmacologicamente activos podem apresentar propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, tais como, baixa biodisponibilidade. A esterificação de um grupo ácido carboxílico tem um efeito imediato no aumento da lipofilia (33). Assim, muitos pró-fármacos contêm uma ligação éster que é formada através da derivatização de grupos fenólicos, hidroxilo ou carboxilo. Quando a ligação éster é clivada o fármaco activo é libertado (30). Assim, e sendo um dos grandes objectivos do desenvolvimento de pró-fármacos melhorar o comportamento farmacocinético dos fármacos, percebe-se o facto de a maioria dos fármacos comercializados serem derivados de ácidos carboxílicos (28).

Um dos problemas associados com os pró-fármacos com ligação éster, é a dificuldade de prever as suas taxas de bioconversão e, conseqüentemente os seus efeitos farmacológicos e toxicológicos (30, 34). Outro problema associado a estes pró-fármacos é a estabilidade do fármaco. Sabe-se que alguns grupos funcionais são mais susceptíveis à degradação química e enzimática. Por exemplo, ésteres e amidas são particularmente susceptíveis à hidrólise. Uma estratégia comum usada para proteger estes grupos é adicionar um grupo alquilo volumoso, como o grupo *terc*-butilo, de forma a impedir a aproximação de um nucleófilo ou de uma enzima ao grupo susceptível (32).

1.2.2. Hidrólise química

A hidrólise química de derivados de ácidos carboxílicos pode ser catalisada por ácido ou base e, em ambos os casos, os mecanismos envolvem adição-eliminação via intermediário tetraédrico – **Figura 6** (28).

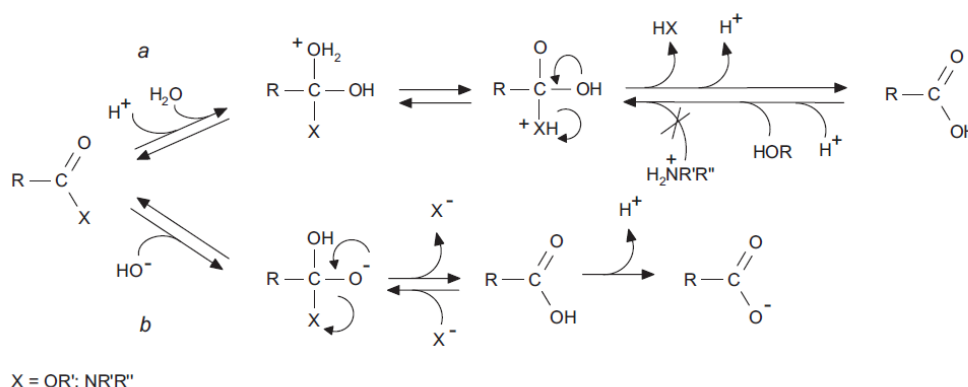


Figura 6 – Esquema geral da hidrólise química de derivados de ácidos carboxílicos. Via a: catálise ácida. Via b: catálise básica (28).

Na catálise ácida a protonação do oxigênio do grupo carbonila leva à polarização do grupo carbonila, facilitando a adição do nucleófilo – molécula de água (via a). Este processo é reversível uma vez que o álcool neutro libertado é nucleofílico. Na catálise básica, o intermediário tetraédrico é formado pela adição de um íon nucleófilo, OH⁻ (via b). Esta reacção é irreversível uma vez que o íon carboxilato formado é desprotonado em meio básico e não estando disponível para ser atacado pelo álcool libertado (28).

1.2.3. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de derivados de ácidos carboxílicos é bastante mais eficaz que a hidrólise química devido ao decréscimo na energia livre de Gibbs no estado de transição (28). As hidrolases possuem uma tríade catalítica constituída por um componente

electrofílico, que aumenta a polarização do grupo carbonilo do substrato (Z^+), um nucleófilo ($Y:$) para atacar o carbono do carbonilo, levando à formação do intermediário tetraédrico e, finalmente, um doador de prótons ($H-B$) que transforma o grupo $-OR'$ num melhor grupo abandonante - **Figura 7** (28).



Figura 7 – Grupos catalíticos comuns na hidrólise de derivados de ácidos carboxílicos (Z^+ - grupo electrofílico que polariza o grupo carbonilo; Y - grupo nucleofílico que ataca o carbonilo; $H-B$ - doador de prótons transformando o grupo $-OR'$ num bom grupo abandonante (28).

Esta tríade catalítica é semelhante em praticamente todas as hidrolases, mas os grupos funcionais diferem. Baseado nas estruturas dos centros catalíticos as hidrolases podem ser divididas em cinco classes, hidrolases de serina, de treonina, de cisteína, de ácido aspártico e metalohidrolases. Existem também hidrolases cujo mecanismo ainda não é conhecido (28). As hidrolases são uma classe de enzimas que demonstram uma vasta especificidade para substratos, podendo hidrolisar péptidos, amidas, haletos assim como ésteres e triglicéridos (35).

1.2.4. Esterases

A clivagem de uma ligação éster ocorre normalmente através de oxidação ou hidrólise. A clivagem por oxidação é catalisada pelas enzimas do citocromo P450. As esterases são um tipo de hidrolases que clivam a ligação éster (28). A classificação das esterases é complicada e confusa. Existem diversos sistemas de classificação mas nenhum parece ser totalmente satisfatório e universalmente aceite (30). De uma forma geral, uma esterase é específica para a porção álcool ou para a porção ácido do substrato, mas não para ambas (35). Um esquema de classificação foi proposto, por Whitaker em 1972, baseado na especificidade destas para a metade ácido da molécula (35). O sistema de classificação do *Enzyme Nomenclature Committee* divide as esterases em classes de acordo com o tipo de ligação éster que clivam – **Tabela 3** (28).

Tabela 3 – Classificação das esterases do *Enzyme Nomenclature Committee* e respectivo número de Comissão (28).

Enzima	Número
Carboxilesterases	3.1.1
Tio-esterases	3.1.2
	3.1.3
	3.1.4
Fosfo-esterases	3.1.5
	3.1.7
	3.1.8
Sulfatases	3.1.6
Nucleases	3.1.11 – 31

As esterases mais importantes que catalisam hidrólises de pró-fármacos incluem carboxilesterases, acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, paraoxonase e arilesterase. Uma vez que as esterases estão largamente distribuídas pelo organismo, as ligações éster são bastante lábeis (30).

As carboxilesterases são membros da família α/β - hidrolases, uma superfamília de enzimas em que o centro de cada enzima é similar: uma estrutura α/β que consiste em oito folhas β ligadas por hélices α (36). Estas enzimas têm funções diversas e incluem colinesterases, hidrolases, lipases e fosfotriesterases (como a paraoxonase) (36). A tríade catalítica – nucleófilo, ácido e histidina – forma a base das propriedades enzimáticas das α/β – hidrolases. O nucleófilo não é o mesmo em cada enzima, podendo ser serina, cisteína ou aspartato. Além disso a família das α/β – hidrolases é o único exemplo de enzimas em que o glutamato é usado como ácido na tríade (37).

Estudos demonstraram que as carboxilesterases estão presentes numa grande variedade de órgãos e tecidos. De todos os tecidos animais estudados a maior actividade hidrolítica ocorre no fígado (28, 38). Além de órgãos com grande actividade destas enzimas como fígado, rim e intestino, as carboxilesterases estão também presentes em órgãos como o cérebro, mucosa nasal, pulmões, testículos e saliva (28).

1.2.5. Esterases no plasma humano

As esterases, no plasma humano, têm um papel fundamental no metabolismo de fármacos. Participam, por exemplo, na activação de pró-fármacos que possuem a ligação éster. Podem ainda inactivar fármacos, destruindo a sua ligação éster antes de atingirem o seu alvo terapêutico e têm um papel fundamental na destoxificação de substâncias tóxicas naturais e sintéticas (39).

Existem quatro esterases no plasma humano:

- acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7)
- butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8)
- paraoxonase (EC 3.1.8.1)
- albumina (39)

A acetilcolinesterase encontra-se apenas em concentrações vestigiais (39). É conhecida por catalisar a hidrólise da acetilcolina, um neurotransmissor que actua nas sinapses colinérgicas e que está relacionado com doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer ou a doença de Parkinson (40).

O organismo humano tem cerca de dez vezes mais butirilcolinesterase do que acetilcolinesterase (41). À semelhança da acetilcolinesterase, a butirilcolinesterase hidrolisa ésteres de colina como a butirilcolina ou a acetilcolina, assim como outros ésteres exógenos como substâncias tóxicas ou fármacos (41).

A paraoxonase é uma família de enzimas constituída por três membros: paraoxonase 1, paraoxonase 2 e paraoxonase 3. Além do seu papel como esterases e protecção contra xenobióticos são antioxidantes e anti-inflamatórias (42). Apenas a paraoxonase 1 existe no plasma (39).

A albumina humana é a proteína mais abundante no plasma humano (28, 43). A sua função primária é controlar a pressão osmótica do sangue, mas é também importante pela sua capacidade tampão e pela sua capacidade para transportar ácidos gordos e bilirrubina, assim como xenobióticos. As implicações fisiológicas da sua actividade como esterase são desconhecidas (28). Enquanto a acetilcolinesterase, a butirilcolinesterase e a paraoxonase são esterases bem conhecidas, a albumina não é normalmente incluída na família das esterases. A albumina não tem um número na comissão de enzimas, o que significa que é considerada como uma proteína sem actividade catalítica (43). Contudo, parece ter um sítio com marcada actividade catalítica e/ou múltiplos sítios catalíticos não específicos. O primeiro sítio reactivo (sítio-R) é composto por um resíduo de tirosina (Tyr-411) e um resíduo de histidina. O sítio secundário (sítio-T), que contribui de forma modesta para a actividade esterásica da proteína, possui um resíduo de lisina como centro catalítico. Finalmente, o sítio-U que parece estar localizado perto de um resíduo triptofano (Trp-214) (44). Apesar da actividade catalítica de uma molécula de albumina ser baixa, a sua elevada concentração faz com que a albumina tenha uma contribuição significativa no metabolismo de fármacos (43, 44).

Em suma, existem apenas quatro proteínas com actividade esterásica no plasma humano, sendo que a acetilcolinesterase se encontra em muito pequena quantidade. Assim, a butirilcolinesterase, a paraoxonase 1 e a albumina são as principais responsáveis pela hidrólise de ésteres no plasma humano (39).

1.2.6. Esterases de micobactérias

Sendo o *M. tuberculosis* rico em vias biossintéticas relacionadas com lípidos, é um microorganismo rico em lipases (número de comissão - 3.1.1.3) (12). A análise do genoma do *M. tuberculosis* revelou 24 genes que podem codificar enzimas lipolíticas, classificadas como a família Lip (10). Contudo, esta descoberta é apenas baseada na presença de uma sequência específica, que é característica de esterases e membros da família das α/β – hidrolases. Esta classificação não permite distinguir entre lipases e esterases (10). Estudos posteriores demonstraram que a família Lip compreende os dois tipos de enzimas, lipases e esterases (10). Enquanto as esterases quebram, preferencialmente, ligações éster com cadeias curtas, as lipases apresentam um intervalo de substratos muito mais alargado (35).

A Rv3487c (LipF), um membro da família Lip está relacionada com a virulência do *M. tuberculosis* (45). A sua caracterização demonstrou que esta enzima pode hidrolisar, de forma eficiente, ésteres de cadeia curta, similarmente a outra esterase, Rv1399c, do mesmo microorganismo (45). O sítio activo de muitas α/β – hidrolases consiste numa tríade catalítica com a serina como nucleófilo, a histidina como transportadora de prótons e o aspartato (ou o glutamato) como grupo ácido (45). Foi demonstrado que o centro catalítico da Rv3487c, que pertence à família das α/β – hidrolases, é constituído por Ser90-Glu189-His219 (45). A tríade catalítica possui um resíduo glutamato em vez do habitual aspartato como no caso da Rv1399c (45).

1.3. Pró-fármacos do ácido pirazinóico

Um dos maiores objectivos do melhoramento do tratamento da tuberculose é o encurtamento do tratamento. Este encurtamento pode trazer vantagens ao nível da adesão ao tratamento, o que iria também reduzir o aparecimento de resistências (22). A diminuição da duração do tratamento pode ser alcançada com a ajuda de novos fármacos, contudo, o processo de investigação e desenvolvimento é bastante moroso, podendo durar décadas. Entretanto, os mesmos objectivos podem ser atingidos através do aumento da actividade antimicobacteriana de alguns fármacos já usados no tratamento, como é o caso da PZA (22).

Análogos da PZA como ésteres do POA, *N*-acilpirazinamida e 5-cloropirazinamida são agentes antimicobacterianos mais potentes que a própria PZA (25). Ésteres do POA demonstraram um espectro de actividade mais alargado, do que a PZA, a outras espécies de micobactérias, tais como *M. avium* e *M. kansasii* (25).

O desenvolvimento de outros pró-fármacos do POA, além da PZA, como ésteres tem sido uma abordagem comum neste campo. O desenvolvimento de ésteres como pró-fármacos do POA poderia contornar o problema da resistência à PZA, uma vez que para se obter o fármaco activo não é necessária pirazinamidase (18, 46, 47). De facto, estudos anteriores já demonstraram que este tipo de pró-fármacos possui boa actividade antimicobacteriana (18, 46, 48). Apesar destes resultados, os pró-fármacos mais promissores apresentavam baixa estabilidade em plasma, não tendo sido desenvolvidos ésteres do POA que além de serem activos fossem estáveis em plasma (49).

Estudos anteriores demonstraram que ésteres do ácido benzóico tornam-se mais resistentes à hidrólise plasmática quando o comprimento da cadeia lateral aumenta (48). É de referir que a estabilidade em plasma, durante a fase de transporte, é fundamental para que o pró-fármaco atinja o seu alvo, não sendo a única característica desejável nestes compostos (48). Os pró-fármacos devem também ser facilmente hidrolisados quando entram na micobactéria de modo a libertarem o fármaco activo e demonstrarem actividade contra *M. tuberculosis* (48).

No trabalho desenvolvido por Simões *et al.* (48), em 2009, foram sintetizados pró-fármacos ésteres e amidas de cadeia longa (12, 14 e 16 carbonos), tendo sido caracterizados relativamente à sua estabilidade em solução tampão, em plasma, homogenato de micobactéria e de fígado de rato. A sua actividade contra *M. tuberculosis* foi também avaliada. A estabilidade química foi estudada pela hidrólise em solução tampão, tendo sido avaliada a sua estabilidade à hidrólise por esterases de mamíferos em plasma humano e homogenato de fígado de rato. A activação dos pró-fármacos foi avaliada usando homogenato de *M. smegmatis* e a sua actividade foi estudada em *M. tuberculosis*. Este estudo demonstrou que tanto as amidas como os ésteres de cadeia longa eram mais resistentes à hidrólise por esterases de mamíferos do que os ésteres de cadeia curta. Observou-se também que os ésteres lipofílicos demonstraram ser mais activos do que POA ou PZA contra o *M. tuberculosis*. Como referido anteriormente, na caracterização do *M. tuberculosis*, a sua parede celular é composta por diversos lípidos, como os ácidos micólicos. Assim, a maioria dos agentes antimicobacterianos têm dificuldades em atravessar esta barreira (50). Uma cadeia lateral lipofílica, como no caso de ésteres do POA de cadeia

mais longa poderá resolver este problema. As amidas demonstraram não ser tão facilmente activadas pelas enzimas das micobactérias, apresentando menor actividade (48).

1.4. Objectivo do trabalho

Pretende-se, com este trabalho, encontrar pró-fármacos do POA que possam ser potenciais alternativas à PZA.

À semelhança do que acontece com a PZA pretende-se que o POA seja libertado dentro da célula da micobactéria. A diferença consiste no facto de o pró-fármaco não ser activado apenas por uma enzima (pirazinamidase), mas por um conjunto de enzimas (esterases micobacterianas). O uso de ésteres como pró-fármacos do POA tem como vantagens o facto de os ésteres não apresentarem carga podendo atravessar as diversas membranas fisiológicas com maior facilidade que o POA e sendo os ésteres activados pelas esterases presentes na célula micobacteriana é menos provável a ocorrência de resistências, uma vez que o *M. tuberculosis* possui uma grande variedade destas enzimas (12).

A possibilidade do uso de ésteres do POA como alternativa à PZA, tem sido estudada por vários grupos de investigação, contudo verificou-se que os compostos mais promissores eram rapidamente hidrolisados em plasma (49). De modo a resolver o problema e a obter pró-fármacos que possam resistir à fase de transporte pretende-se estudar a hidrólise de ésteres do POA pelas enzimas plasmáticas.

Para que estes ésteres do POA sejam efectivos *in vivo* é fundamental, por um lado, que sejam compostos suficientemente hidrofílicos para atingirem concentrações plasmáticas suficientes para que o fármaco chegue ao local de acção. Por outro lado, as cadeias laterais devem ser suficientemente lipofílicas para conseguir penetrar na célula da micobactéria. Deste modo na escolha da cadeia alquílica dos referidos ésteres foram tidos em conta diversos factores, como é o caso do impedimento estereoquímico e da lipofilia, de modo a serem activos nas micobactérias e simultaneamente resistentes às esterases humanas do plasma e fígado.

O objectivo deste trabalho é, assim, sintetizar novos ésteres derivados do POA avaliando a correspondente estabilidade química e enzimática. Na escolha da cadeia alquílica dos referidos ésteres haverá diversos factores a ter em conta, como é o caso do impedimento estereoquímico, da polaridade e da lipofilia.

II – Síntese e identificação estrutural

2. Síntese e identificação estrutural

2.1. Síntese dos ésteres derivados do ácido pirazinóico

A síntese de ésteres é feita, normalmente, a partir de um cloreto de ácido ou anidrido e de um álcool na presença de uma base – **Figura 8**. Na reacção directa de ácidos carboxílicos com álcoois na presença de uma base ocorre apenas a desprotonação do ácido originando o ião carboxilato. Estando o ácido carboxílico desprotonado, não ocorrem substituições uma vez que quase nenhum nucleófilo é suficientemente forte para atacar o anião carboxilato (51).

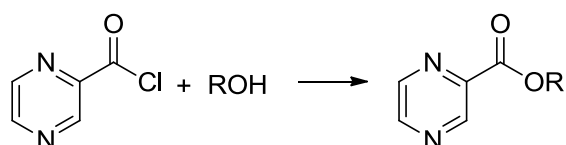


Figura 8 – Reacção geral de síntese de um éster derivado do ácido pirazinóico.

O primeiro passo da reacção é a adição nucleofílica do álcool ao carbono carbonílico electrofílico. A adição de uma base é fundamental uma vez que esta remove o protão do álcool, assim que este ataca o grupo carbonilo. As bases normalmente usadas para este efeito são a piridina ou a trietilamina. O intermediário tetraédrico formado é instável e colapsa através de uma reacção de eliminação, perdendo o ião cloreto e formando o éster. Assim, o ião cloreto é o grupo de saída saindo na forma de anião – **Figura 9**.

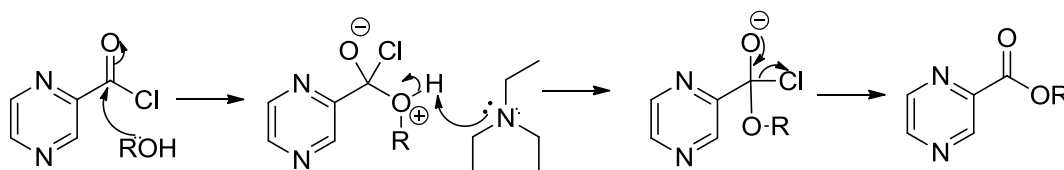


Figura 9 – Mecanismo da reacção de esterificação usando como base a trietilamina (TEA).

2.1.1. Síntese do cloreto do ácido pirazinóico

A síntese dos ésteres derivados do POA iniciou-se com a preparação do correspondente cloreto de ácido do POA. A 1.2 equivalentes (eq.) do POA foi adicionado cloreto de tionilo (SOCl_2) em excesso (como solvente da reacção) – **Figura 10**.

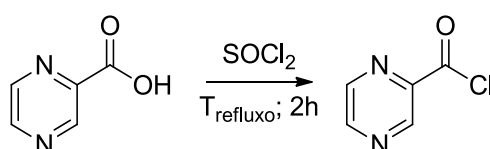


Figura 10 – Esquema da reacção da síntese do cloreto do ácido pirazinóico.

Os cloretos de ácido podem ser feitos a partir de ácidos carboxílicos usando SOCl_2 ou pentacloreto de fósforo (PCl_5), uma vez que estes reagentes conseguem transformar o grupo OH do ácido carboxílico num bom grupo abandonante. O SOCl_2 é um líquido volátil com odor muito activo. Possui um átomo de enxofre altamente electrofílico, pois tem dois átomos de cloro e um de oxigénio ligados a ele, podendo ser atacado por ácidos carboxílicos, originando um intermediário instável. O ácido clorídrico (HCl) produzido na reacção protona o intermediário originando um electrófilo poderoso suficiente para reagir com o ião cloreto (Cl^-), um nucleófilo fraco. O intermediário tetraédrico formado origina o cloreto de acilo, dióxido de enxofre (SO_2) e HCl . Este passo é irreversível porque o SO_2 e o HCl estão no estado gasoso libertando-se da mistura reaccional. Apesar do HCl estar envolvido na reacção, não pode ser utilizado como único reagente, uma vez que é necessário um átomo de enxofre ou fósforo para remover o oxigénio (51) – **Figura 11**.

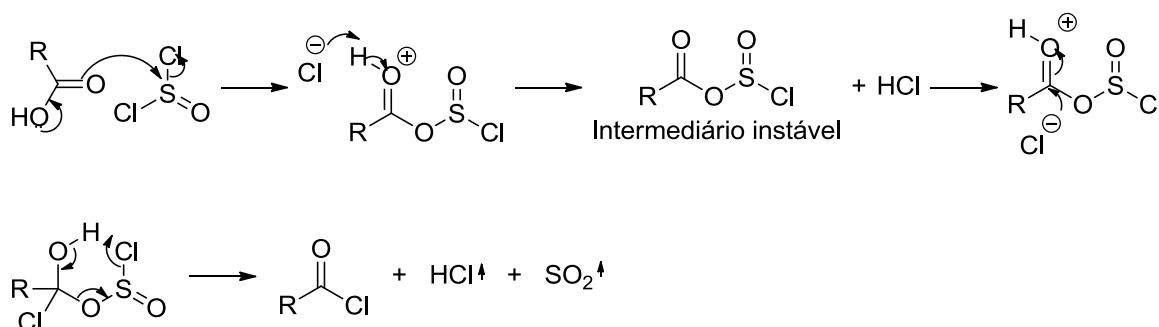


Figura 11 – Mecanismo da reacção de síntese de um cloreto de ácido usando cloreto de tionilo

2.1.2. Síntese dos ésteres derivados do ácido pirazinóico

Na síntese dos ésteres derivados do POA preparados no presente trabalho, foram utilizados dois métodos. Para a reacção com álcoois primários utilizou-se o método, baseado na descrição feita por Cynamom *et al.* em 1995 (52) — método A. Para álcoois secundários ou terciários preparou-se o derivado alcóxido do álcool que se fez reagir com o cloreto do POA, visto serem mais impedidos estereoquimicamente e como tal menos reactivos — método B.

Método A

A 1.2 eq. do cloreto de ácido preparado adicionou-se 1 eq. do álcool. Seguidamente, adicionou-se 1.2 eq. de trietilamina, de uma forma lenta e com agitação – **Figura 12**.

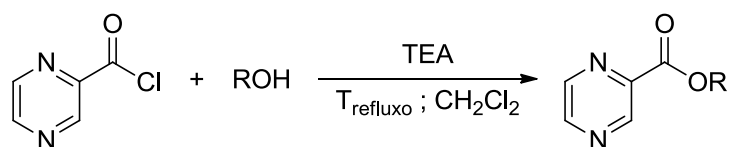


Figura 12 – Esquema da reacção de síntese usada no método A.

Método B

Fez-se reagir 1 eq. do álcool com 1.5 eq. de hidreto de sódio (NaH). Adicionou-se esta mistura reaccional ao cloreto do POA, previamente sintetizado – **Figura 13**.

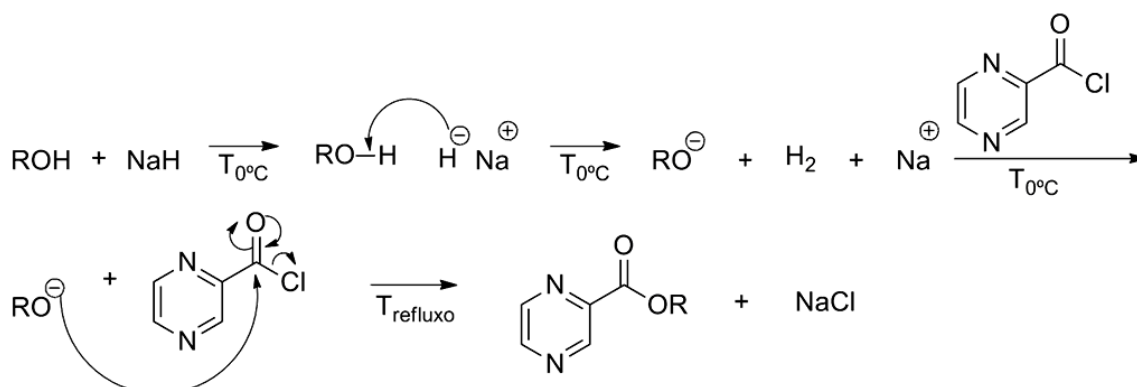


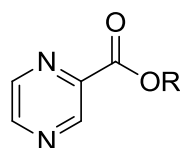
Figura 13 – Esquema da reacção de síntese usada no método B.

2.1.3. Ésteres do ácido pirazinóico sintetizados

2.1.3.1. Ésteres de cadeia alquílica linear

Os ésteres de cadeia alquílica linear foram sintetizados, como referido no parágrafo anterior pelo método A variando as correspondentes cadeias alquílicas lineares entre 5 a 11 carbonos de comprimento – **Tabela 4**.

Tabela 4 – Ésteres do ácido pirazinóico com cadeias alquílicas lineares



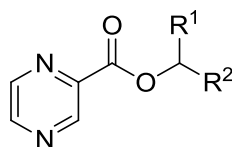
Composto	R	Método	Tempo refluxo/h	Rendimento η (%)
4a Pirazinoato de pentilo	C ₅ H ₁₁	A	65	72
4b Pirazinoato de hexilo	C ₆ H ₁₃	A	70	67
4c Pirazinoato de heptilo	C ₇ H ₁₅	A	11	56
4d Pirazinoato de octilo	C ₈ H ₁₇	A	4	44
4e Pirazinoato de nonilo	C ₉ H ₁₉	A	20	76
4f Pirazinoato de decilo	C ₁₀ H ₂₁	A	17	57
4g Pirazinoato de undecilo	C ₁₁ H ₂₃	A	14	63

Obtiveram-se rendimentos entre os 44 e os 76 %, tendo sido o pior resultado observado na síntese do pirazinoato de octilo, **4d**.

2.1.3.2. Ésteres com uma ramificação no carbono adjacente à função éster

Inicialmente utilizou-se o mesmo método descrito para ésteres com cadeia alquílica linear – Método A. No entanto, verificou-se que os rendimentos eram baixos, tendo-se recorrido ao método alternativo para a síntese dos restantes derivados – Método B (Tabela 5).

Tabela 5 – Ésteres do ácido pirazinóico com cadeias alquílicas com uma ramificação no primeiro carbono



Composto	R ¹	R ²	Método	Tempo refluxo/h	η (%)
5a Pirazinoato de isopropilo	CH ₃	CH ₃	A	35	20
5b Pirazinoato de <i>sec</i> -butilo	CH ₃	C ₂ H ₅	A B	18	21 38
5c Pirazinoato de 1-metil-hexilo	CH ₃	C ₅ H ₁₁	B	21	58
5d Pirazinoato de <i>R</i> -(-)-1-metil-hexilo	CH ₃	C ₅ H ₁₁	B	27	36
5e Pirazinoato de <i>S</i> -(+)-1-metil-hexilo	CH ₃	C ₅ H ₁₁	B	27	66
5f Pirazinoato de 1-metil-heptilo	CH ₃	C ₆ H ₁₃	B	10	59
5g Pirazinoato de 1-metil-octilo	CH ₃	C ₇ H ₁₅	B	10	58
5h Pirazinoato de 1-metil-nonilo	CH ₃	C ₈ H ₁₇	B	19	64
5i Pirazinoato de 1-metil-undecilo	CH ₃	C ₁₀ H ₂₁	B	8	76

Nos rendimentos obtidos em ésteres com uma ramificação no primeiro carbono a amplitude dos valores de rendimentos obtidos foi bastante maior do que nos anteriores, de 20 a 76 %. Esta discrepância deve-se, em parte, à utilização de dois métodos diferentes, o método A e o método B. Para o pirazinoato de isopropilo, **5a**, utilizou-se o mesmo método que para a síntese dos derivados com cadeias sem ramificações. Contudo, verificou-se que o rendimento era bastante mais baixo, 20 %. O rendimento mais baixo poderá estar relacionado com o maior impedimento estereoquímico observado para este tipo de compostos. Deste modo, começou a utilizar-se o método B de modo a activar o álcool antes da sua reacção com o cloreto de ácido. Na síntese do pirazinoato de *sec*-butilo, **5b**, utilizaram-se ambos os métodos de síntese e para o mesmo tempo de refluxo, 18 h, observou-se que o rendimento aumentou de 21 para 38%. Deste modo, a melhoria relativamente ao método A foi notável.

Sintetizaram-se ainda 3 derivados semelhantes, sendo que a diferença está na estereoquímica do primeiro carbono da cadeia alquílica. O pirazinoato de 1-metil-hexilo, **5c**, foi sintetizado a partir da mistura racémica do álcool. O pirazinoato de *R*-(-)-1-metil-hexilo,

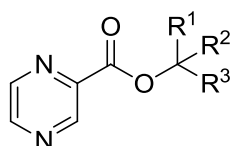
5d, e o pirazinoato de S-(+)-1-metil-hexilo, **5e**, foram sintetizados a partir dos respectivos álcoois enantiomericamente puros.

Os rendimentos dos derivados com uma ramificação no primeiro carbono sintetizados pelo método B foram razoáveis, oscilando entre os 16 e os 76%.

2.1.3.3. Ésteres com duas ramificações no carbono adjacente à função éster

Os ésteres com duas ramificações no carbono adjacente à função éster foram sintetizados de acordo com o método B. Os resultados obtidos estão resumidos na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Ésteres do ácido pirazinoico com cadeias alquílicas com três ramificações no primeiro carbono



Composto	R ¹	R ²	R ³	Método	Tempo refluxo/h	η (%)
6a Pirazinoato de <i>tert</i> -butilo	CH ₃	CH ₃	CH ₃	B	31	21
6b Pirazinoato de 1,1-dimetilpropilo	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	B	12	28
6c Pirazinoato de 1,1-dimetilbutilo	CH ₃	CH ₃	C ₃ H ₇	B	8	24
6d Pirazinoato de 1,1-dimetilpentilo	CH ₃	CH ₃	C ₄ H ₉	A B	88 18	2 22
6e Pirazinoato de 1,1-dimetilhexilo	CH ₃	CH ₃	C ₅ H ₁₁	B	27	11

Na síntese de derivados a partir de álcoois terciários, mais impedidos estereoquimicamente, os rendimentos foram bastante baixos. O facto de haver um maior impedimento estereoquímico torna a reacção mais difícil. Para verificar, mais uma vez a eficácia dos dois métodos, sintetizou-se o pirazinoato de 1,1-dimetilpentilo, **6d**, pelos dois métodos. Verificou-se que a reacção pelo método A foi bastante menos eficiente, apesar do tempo em refluxo ter sido consideravelmente maior. Além disso, verificou-se uma maior existência de produtos secundários na reacção. Os produtos laterais desta reacção não foram isolados e analisados, apenas observados por cromatografia em camada fina.

Na perspectiva de melhorar os rendimentos destes derivados tentou-se um terceiro método. O método está descrito para a síntese de ésteres *tert*-butílicos e envolve o 2,2,2-tricloroacetimidato de *tert*-butilo e o trifluoroeterato de boro como catalisador – **Figura 14** (53).

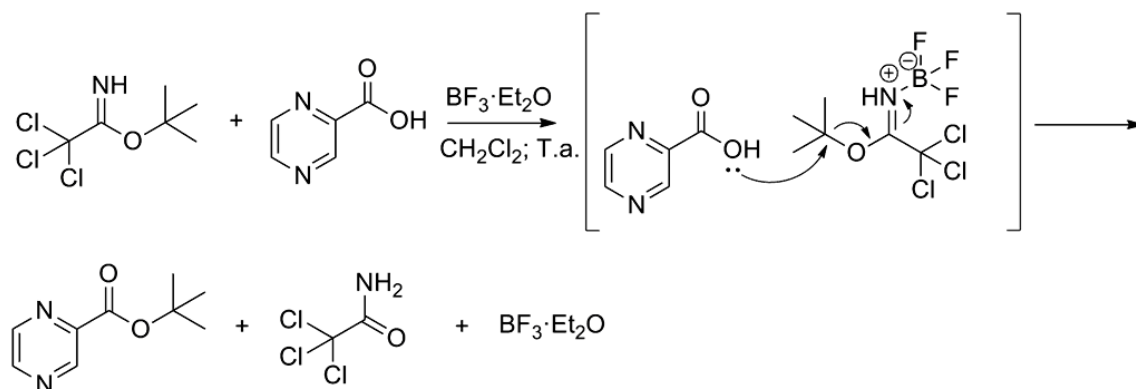


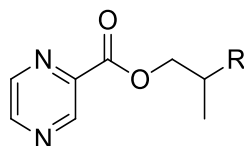
Figura 14 – Mecanismo da reacção do ácido pirazinóico com o 2,2,2-tricloroacetimidato de *tert*-butilo (54).

Após obter o produto final analisou-se por espectroscopia de RMN e verificou-se que o composto isolado não correspondia ao pirazinoato de *tert*-butilo. Repetiu-se a reacção, colocando-se, desta vez a temperatura de refluxo. Analisou-se novamente por espectroscopia de RMN e verificou-se que nenhum dos produtos isolados correspondia ao composto pretendido. Uma das razões para a reacção não ter resultado pode ser a pouca solubilidade do POA em diclorometano.

2.1.3.4. Ésteres com uma ramificação no segundo ou terceiro carbono da cadeia alquílica

Os ésteres com uma ramificação no segundo ou terceiro carbono da cadeia alquílica foram sintetizados de acordo com o método A descrito anteriormente estando os resultados obtidos resumidos nas **Tabelas 7 e 8**.

Tabela 7 – Ésteres do ácido pirazinóico com cadeias alquílicas com uma ramificação no segundo carbono

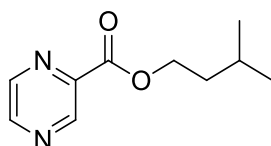


Composto	R	Método	Tempo refluxo/h	η (%)
7a Pirazinoato de isobutilo	CH ₃	A	17	50
7b Pirazinoato de 2-metilbutilo	C ₂ H ₅	A	13	54

Quando a ramificação acontece no segundo carbono o impedimento estereoquímico não tem um efeito tão prejudicial na reacção, como se pode observar pelos rendimentos obtidos nestes dois derivados, através da reacção utilizando o método A. Num estudo futuro será relevante repetir a síntese destes compostos com o método alternativo, B, e comparar

resultados. O mesmo se observa quando a ramificação está no terceiro carbono, como é o caso do pirazinoato de isopentilo, **8a**.

Tabela 8 – Pirazinoato de isopentilo

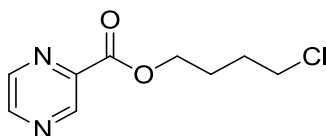


	Composto	Método	Tempo refluxo/h	η (%)
8a	Pirazinoato de isopentilo	A	8	60

2.1.3.5. Pirazinoato de 4-clorobutilo

O derivado pirazinoato de 4-clorobutilo foi obtido como um subproduto da síntese do composto pirazinoato de 1,1-dimetilheptilo, usando o método B, não se conseguindo isolar o produto pretendido. Este produto obtido resultou da uma abertura do anel de THF (solvente utilizado) na reacção posterior com o cloreto do POA — **Tabela 9**.

Tabela 9 – Pirazinoato de 4-clorobutilo



	Composto	Método	Tempo refluxo/h	η (%)
9a	Pirazinoato de 4-clorobutilo	B	19	19

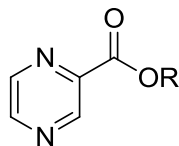
Pensa-se que o NaH de algum modo serviu de catalisador na abertura do anel de THF tendo-se ligado no fim da cadeia um átomo de cloro, já que a reacção de abertura do anel de THF com cloretos de acilo é um método descrito e útil para a preparação de ésteres 4-halobutílicos (55). Embora o mecanismo reaccional não esteja ainda bem esclarecido, verificou-se tanto por espectroscopia de RMN e espectrometria de massa não só a sua estrutura como a sua pureza. Deste modo, o derivado obtido nesta reacção foi também estudado quanto à sua estabilidade e actividade.

2.1.3.6. Ésteres com grupos laterais aromáticos ou cíclicos adjacentes à função éster

Os ésteres com grupos laterais cíclicos ou aromáticos foram sintetizados de acordo com o método A, caso não apresentem ramificação, ou com o método B, caso apresentem uma

ramificação no carbono adjacente à função éster, estando os resultados obtidos resumidos na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Ésteres do ácido pirazínóico grupos laterais cíclicos ou aromáticos



Composto	R	Método	Tempo refluxo/h	η (%)
10a Pirazinoato de fenilo	C ₆ H ₅	A	17	50
10b Pirazinoato de ciclo-hexilo	C ₆ H ₁₁	A	13	54
10c Pirazinoato de 1-metilciclo-hexilo	(CH ₃)C ₆ H ₁₁	B	28	28

Relativamente aos derivados com grupos laterais cíclicos a diferença de rendimentos deve-se à presença do grupo metilo que, devido à sua posição, cria impedimento estereoquímico e conseqüentemente maior dificuldade de reacção. Apesar da grande diferença dos rendimentos, pensa-se que a diferença não é tão acentuada devido à utilização do método B na síntese do pirazinoato de 1-metilciclo-hexilo, **10c**.

2.2. Identificação estrutural dos compostos sintetizados

2.2.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de protão (¹H) e carbono (¹³C) foram obtidos em clorofórmio deuterado (CDCl₃) usando como padrão o próprio solvente. Os espectros de todos os compostos sintetizados estão descritos no capítulo **VI – Procedimento Experimental**.

Após análise dos espectros de RMN de protão (¹H-RMN) observou-se que os desvios químicos dos protões aromáticos são semelhantes entre os vários derivados, verificando-se apenas ligeiras variações nos desdobramentos dos sinais obtidos, consoante a resolução obtida no espectro correspondente.

As constantes de acoplamento observadas foram $J_{3-5} \approx 1.01$ a 1.45 Hz e $J_{5-6} \approx 2.30$ a 2.72 Hz, podendo ser observados, por vezes, os dupletos nos protões ligados a C₆ e a C₃. Relativamente aos protões ligados a C₄ normalmente observa-se um duplete em vez do esperado duplo duplete, sendo que em espectros com pior resolução apenas se observa um singuleto largo.

Relativamente aos protões das cadeias alquílicas é de salientar a sobreposição de sinais de diferentes protões, especialmente quando a cadeia alquílica é longa. Em todos os grupos laterais com um grupo metilo terminal observou-se o respectivo tripleto a cerca de 0.90 ppm.

No que respeita aos espectros de RMN de carbono (^{13}C -RMN) os sinais do carbono do carbonilo aparecem entre 163 a 165 ppm. Os carbonos aromáticos encontram-se entre os 147/148 ppm e os 144/145 ppm, sendo que o pirazinoato de fenilo apresenta, na sua porção aromática proveniente do POA, valores ligeiramente superiores aos dos restantes derivados. Os desvios químicos destes carbonos oscilam entre os 150.46 ppm e os 144.67 ppm. Relativamente às cadeias alquílicas o carbono com maior desvio químico é aquele que se encontra ligado ao oxigénio do grupo éster.

Na identificação do composto **9a**, pirazinoato de 4-clorobutilo, fizeram-se ainda espectros de RMN bidimensionais homo e heteronucleares de modo a confirmar a estrutura do composto, uma vez que após análise do espectro de ^1H , não se observava nenhum tripleto com ppm na ordem dos 0.90 ppm, como era esperado para o grupo CH_3 terminal do composto pirazinoato de 1,1-dimetilheptilo. Em vez desse sinal observa-se um tripleto mais desblindado, com ppm de 3.60, que se colocou a hipótese de estar ligado a um heteroátomo, sendo confirmado estar ligado a um átomo de cloro através de uma análise de espectrometria de massa.

2.2.2. Espectroscopia de infra-vermelho

Nos espectros de infra-vermelho (I.V.) a banda característica do grupo éster aparece entre 1735 a 1750 cm^{-1} , devendo ser mais fraca do que a dos anidridos e mais forte que a das aminas (51). Os resultados obtidos mostram que, as bandas dos ésteres obtidos, variam entre 1715 e 1728 cm^{-1} , um pouco abaixo do descrito na literatura consultada. Contudo a referência consultada não indica os valores esperados para as bandas deste tipo específico de derivados.

2.2.3. Espectrometria de massa

Fez-se ainda um espectro de massa de baixa resolução para confirmar o peso molecular do composto **9a**. Era esperado um composto com massa de 214.65 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e o pico base obtido foi de 237.06 ou seja 214 + 23 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Observou-se ainda a existência de um segundo pico, com cerca de um terço do tamanho do pico base, de 239.06 m/z indicando a existência de um átomo de cloro na molécula, já que este possui dois isótopos, o cloro-35 (maioritário) e cloro-37, explicando a diferença entre os dois picos confirmando a presença de um átomo de cloro na molécula.

II - Estudos de estabilidade e actividade

3. Estudos de estabilidade e actividade

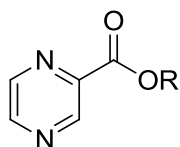
A estabilidade dos derivados sintetizados foi estudada em tampão fosfato pH=7.4 e em plasma humano de modo a verificar a resistência destes pró-fármacos à hidrólise, tanto química como enzimática, no hospedeiro antes de atingirem as micobactérias alvo. A hidrólise dos compostos foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tendo sido avaliada a variação das concentrações dos ésteres (substrato) e do POA (produto resultante dessas hidrólises). Este estudo processou-se de acordo com a técnica descrita no capítulo VI – **Procedimento Experimental**. Os testes de actividade *in vitro* foram realizados no Centro de Patogénese Molecular- Unidade dos Retrovírus e Infecções Associadas (CPM-URIA) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

3.1. Estudo da estabilidade em tampão fosfato

Estudou-se a hidrólise química dos ésteres do POA em tampão fosfato pH = 7.4, de modo a avaliar a sua influência nos estudos enzimáticos, uma vez que estes iriam ser feitos em meio semelhante. Para isso preparou-se uma solução de tampão fosfato com a concentração total (Ct) de 0.05 M, força iónica (I) 0.15 M, e um pH de 7.4 (56). A estabilidade de todos os derivados foi avaliada para este pH em soluções com 2% de acetonitrilo e a 37°C uma vez que este é o pH e a temperatura do corpo humano. A hidrólise do éster levou sempre ao aparecimento do respectivo ácido orgânico, como era esperado.

Tabela 11 – Hidrólise dos ésteres derivados do ácido pirazinóico em tampão fosfato pH=7.4.

(Ct=0,05M, I=0,15M com 2% de acetonitrilo) pH=7.4, à temperatura T=37°C, n=3 - número de amostras para cada composto. Concentração inicial de substrato – 5×10^{-4} M.



Tampão fosfato pH 7.4

Composto	R	($10^3 \times$) k_{obs}/h^{-1}	$t_{1/2}/h$
4a	C ₄ H ₉	29.5 ± 3.5	23.7 ± 3.03
4b	C ₅ H ₁₁	24.8 ± 1.51	28.0 ± 1.75
5a	(CH ₃)CH ₃	7.53 ± 0.073	92.1 ± 0.900
5b	(CH ₃)C ₂ H ₅	4.91 ± 0.228	141 ± 6.39
6a	(CH ₃) ₂ CH ₃	26.0 ± 0.109	26.7 ± 0.111
6b	(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅	75.0 ± 4.21	9.26 ± 0.530
6c	(CH ₃) ₂ C ₃ H ₇	74.9 ± 1.20	9.25 ± 0.150
6d	(CH ₃) ₂ C ₄ H ₁₁	112 ± 0.400	6.18 ± 0.020
7a	CH(CH ₃) ₂	21.6 ± 1.87	32.1 ± 2.70
7b	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	14.0 ± 0.309	49.7 ± 1.09
10a	C ₆ H ₅	526 ± 12.4	1.32 ± 0.031
10b	C ₆ H ₁₀	8.16 ± 0.566	85.2 ± 5.73

Composto	R	$(10^3 \times) k_{\text{obs}}/\text{h}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{h}$
10c	$(\text{CH}_3) \text{C}_6\text{H}_{10}$	31.3 ± 0.748	22.2 ± 0.524

Pode observar-se que as constantes de *pseudo*-primeira ordem (k_{obs}) variam entre $526 \pm 12.4 \text{ h}^{-1}$, registada para o pirazinoato de fenilo, **10a**, e $4.91 \pm 0.228 \text{ h}^{-1}$ para o pirazinoato de *sec*-butilo, **5b**, sendo este o composto mais estável à hidrólise química a pH 7.4. Quando existe uma ramificação no segundo carbono, o derivado com cadeia de menor comprimento, pirazinoato de isobutilo, **7a**, apresenta maior estabilidade que o pirazinoato de 2-metilbutilo, **7b**. Relativamente aos derivados cíclicos, o pirazinoato de ciclo-hexilo, **10b**, apresenta maior estabilidade que o pirazinoato de 1-metilciclo-hexilo, **10c**.

Para os estudos de estabilidade em tampão fosfato pH 7.4 pode observar-se que o desaparecimento do éster corresponde ao aparecimento do ácido – **Figuras 15 a 17**. Note-se que os resultados resultam de ensaios em triplicado e as concentrações foram calculadas com base nas expressões resultantes das respectivas curvas de calibração.

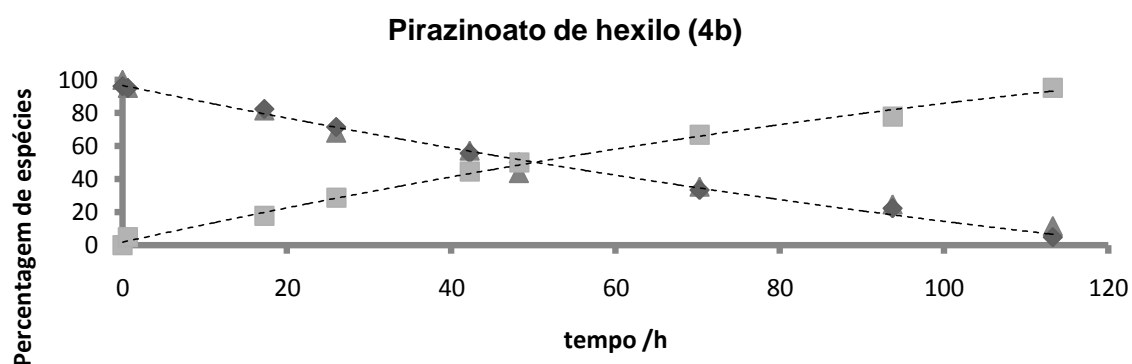


Figura 15 – Variação da percentagem de éster e da percentagem de ácido ao longo tempo para o composto pirazinoato de hexilo (**4b**).

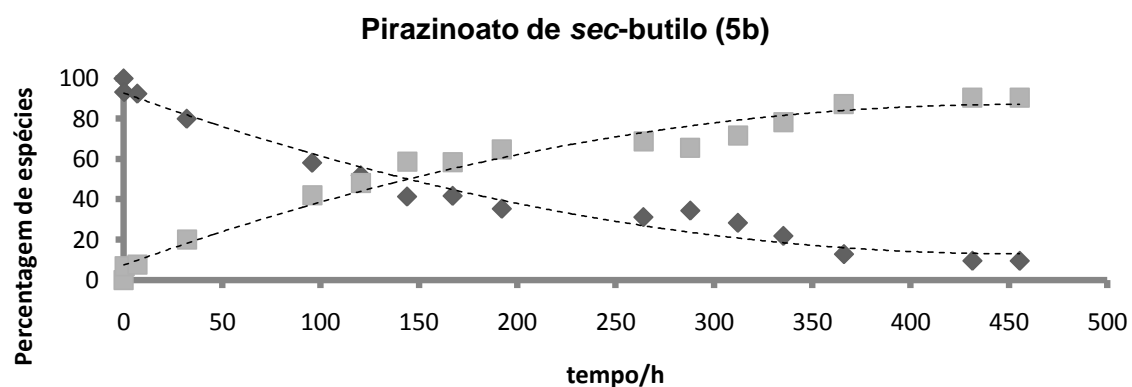


Figura 16 – Variação da percentagem de éster e da percentagem de ácido ao longo tempo para o composto pirazinoato de *sec*-butilo (**5b**).

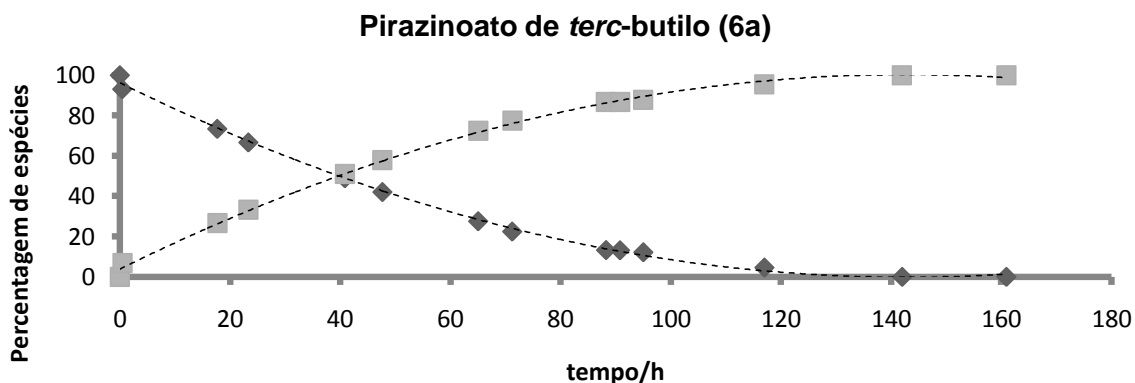


Figura 17 – Variação da porcentagem de éster e da porcentagem de ácido ao longo tempo para o composto pirazinoato de *terc*-butilo (6a).

Para os compostos que não estão representados na **Tabela 11**, não se observou um aumento do sinal referente ao POA à medida que o sinal do éster diminuía, indicando, provavelmente, um processo de precipitação do éster, já que a sua diminuição era maior que o aumento do ácido.

Para tentar provar que o decréscimo observado para o éster e o não correspondente aumento do ácido se devia à precipitação do éster no meio aquoso (solução tampão), realizaram-se estudos em tampão fosfato pH=7.4 (Ct=0,05M, I=0,15M) com 20% de acetonitrilo, em vez de 2% de acetonitrilo como nos estudos anteriores, e observou-se que no caso do composto **5c**, pirazinoato de 1-metil-hexilo, o meio com 20% de acetonitrilo permitiu observar o aparecimento do ácido à medida que o éster desaparecia. Verificou-se no entanto que o meio com 20% de acetonitrilo não era ainda suficiente para evitar a precipitação de ésteres com cadeias laterais com um maior número de carbonos como é o caso do composto **5i**, pirazinoato de 1-metilundecilo.

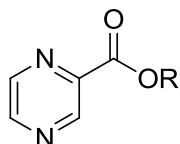
Assim, para compostos com cadeias laterais longas observou-se, de um modo geral, precipitação do éster quando em soluções de tampão fosfato. Para avaliar a estabilidade destes derivados seria necessário aumentar a concentração de acetonitrilo em solução. Contudo, estudos prévios demonstraram que a maior concentração de acetonitrilo em solução tem como consequência diminuir a velocidade de hidrólise dos compostos (57). Além disso pretende-se calcular as velocidades de hidrólise em tampão fosfato pH 7.4 e não em acetonitrilo, sendo este apenas um meio de melhor solubilização dos derivados.

3.2. Estabilidade em plasma humano

O estudo da estabilidade em plasma humano relaciona-se com a necessidade de avaliar a hidrólise enzimática pelas esterases do plasma humano. É desejável que estes compostos apresentem grande estabilidade face a esterases de mamíferos para que atinjam o local de acção, *M. tuberculosis*, em concentração suficiente sendo então convertidos no POA pelas esterases das micobactérias.

Nos estudos de estabilidade em plasma humano dos ésteres desenvolvidos no presente trabalho, o plasma estava diluído a 80% em tampão fosfato a pH 7.4 sendo a concentração inicial dos substratos igual a 5×10^{-4} M. As constantes de *pseudo*-primeira ordem (k_{obs}) para a hidrólise em plasma humano dos ésteres sintetizados bem como os correspondentes tempos de semi-vida encontram-se resumidos na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Hidrólise dos ésteres derivados do ácido pirazinóico em plasma humano a 80% em tampão fosfato pH=7.4 ($C_t=0,05$ M, $I=0,15$ M com 2% de acetonitrilo), à temperatura $T=37^\circ\text{C}$, $n=3$ - número de amostras para cada composto. Concentração inicial de substrato – 5×10^{-4} M.



Plasma humano

Composto	R	($10^3 \times$) k_{obs}/min^{-1}	$t_{1/2}/\text{min}$
4a	C ₄ H ₉	364 ± 22.3	1.90 ± 0.116
4b	C ₅ H ₁₁	262 ± 2.83	2.60 ± 0.029
4c	C ₆ H ₁₃	306 ± 15.3	2.30 ± 0.117
4d	C ₇ H ₁₅	349 ± 1.79	2.00 ± 0.010
4e	C ₈ H ₁₇	196 ± 5.31	3.50 ± 0.097
4f	C ₉ H ₁₉	86.8 ± 3.20	8.00 ± 0.298
4g	C ₁₀ H ₂₁	51.3 ± 0.534	13.5 ± 0.141
5a	(CH ₃)CH ₃	8.74 ± 3.34x10 ⁻⁰²	79.3 ± 0.303
5b	(CH ₃)C ₂ H ₅	36.0 ± 2.05	19.3 ± 1.10
5c	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	43.0 ± 0.492	16.1 ± 0.186
(R)-5d	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	47.8 ± 0.281	14.5 ± 0.085
(S)-5e	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	23.7 ± 0.948	29.3 ± 1.20
5f	(CH ₃)C ₆ H ₁₃	27.8 ± 0.687	25.0 ± 0.623
5g	(CH ₃)C ₇ H ₁₅	29.6 ± 1.49	23.5 ± 1.16
5h	(CH ₃)C ₈ H ₁₇	16.5 ± 0.366	42.0 ± 0.942
5i	(CH ₃)C ₁₀ H ₂₁	5.87 ± 0.530	119 ± 11.3
6a	(CH ₃) ₂ CH ₃	0.430 ± 2.03x10 ⁻⁰²	1614 ± 77.2
6b	(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅	0.908 ± 4.16x10 ⁻⁰²	764 ± 35.3
6c	(CH ₃) ₂ C ₃ H ₇	1.58 ± 4.02x10 ⁻⁰²	438 ± 11.3
6d	(CH ₃) ₂ C ₄ H ₉	1.20 ± 1.98x10 ⁻⁰²	578 ± 9.66
6e	(CH ₃) ₂ C ₅ H ₁₁	2.00 ± 3.87x10 ⁻⁰²	347 ± 6.66
7a	CH(CH ₃) ₂	135 ± 4.30	5.20 ± 0.161
7b	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	333 ± 2.29	2.1 ± 0.014
8a	C ₃ H ₆ CH(CH ₃) ₂	385 ± 10.9	1.80 ± 0.050
9a	C ₄ H ₈ Cl	73.5 ± 6.85	9.49 ± 0.884

Composto	R	(10 ³ x) k_{obs}/min^{-1}	$t_{1/2}/\text{min}$
10a	C ₆ H ₅	$1.94 \times 10^{04} \pm 1.95 \times 10^{03}$	0.036 ± 0.004
10b	C ₆ H ₁₀	160 ± 7.02	4.3 ± 0.188
10c	(CH ₃)C ₆ H ₁₀	$0.575 \pm 4.82 \times 10^{-03}$	1206 ± 10.1

Os compostos com carbonos terciários junto ao grupo éster são aqueles que apresentam um valor de k_{obs} mais baixo, e como tal, maior estabilidade. De notar que o composto mais estável à hidrólise em plasma é o pirazinoato de *terc*-butilo, **6a**, seguido do pirazinoato de 1-metilciclo-hexilo, **10c**, e do pirazinoato de 1,1-dimetilpropilo, **6b**. O derivado mais susceptível à hidrólise em plasma é o pirazinoato de fenilo, **10a**, à semelhança dos resultados de hidrólise química.

Quanto à estereoquímica, pode observar-se que o isómero (**R**) – **5d**, é menos estável que a mistura racémica e que o isómero (**S**) - **5e**. O seu valor de k_{obs} é mais do dobro do valor de k_{obs} do respectivo enantiómero. Para verificar a relação da estereoquímica com a estabilidade enzimática poder-se-iam fazer mais estudos, a nível teórico (química computacional), mas também a nível prático (sintetizar um maior número de enantiómeros e verificar se esta relação se mantinha).

Para os estudos de estabilidade em plasma pode observar-se que o desaparecimento do éster corresponde ao aparecimento do ácido, como se apresenta a título de exemplo para o pirazinoato de 1-metilundecilo (**5i**) – **Figura 18**. Note-se que os resultados resultam de uma análise em triplicado e as concentrações foram calculadas com base nas expressões resultantes das respectivas curvas de calibração.

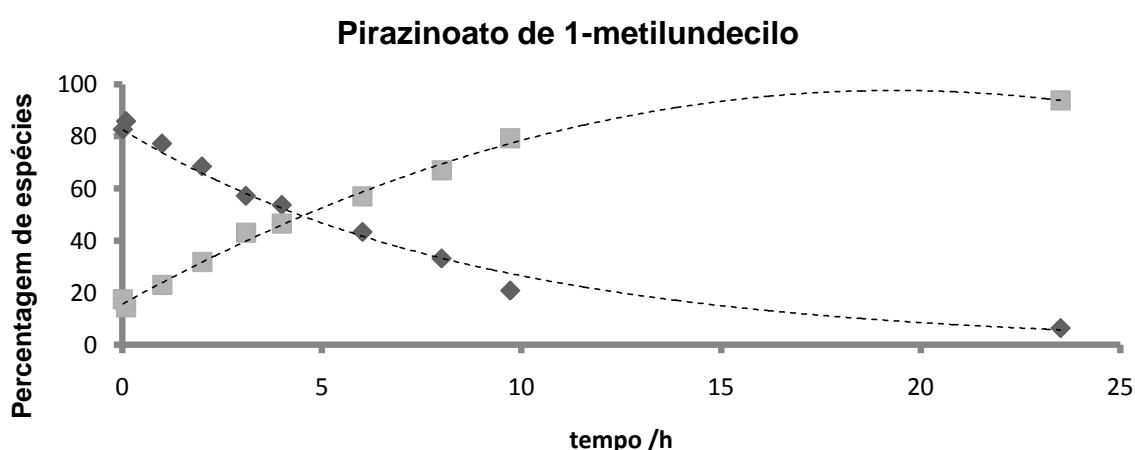


Figura 18 – Variação da percentagem de éster e da percentagem de ácido ao longo tempo para o composto pirazinoato de 1-metilundecilo (**5i**).

3.3. Razão estabilidade plasma/estabilidade tampão fosfato pH 7.4

Para avaliar a contribuição do processo de hidrólise química no processo de hidrólise enzimática compararam-se as constantes de *pseudo*-primeira ordem obtidas em tampão pH 7.4 com as constantes obtidas em plasma (hidrólise enzimática) – **Tabela 13**.

Tabela 13 – Razão entre k_{obs}/h^{-1} da hidrólise em plasma e k_{obs}/h^{-1} da hidrólise em tampão fosfato pH 7.4

Composto	k_{obs}/h^{-1} da hidrólise em plasma	k_{obs}/h^{-1} da hidrólise em tampão fosfato pH 7.4	Razão
4a	21.8	2.95×10^{-2}	740
4b	15.7	2.48×10^{-2}	634
5a	0.524	7.53×10^{-3}	70
5b	2.16	4.91×10^{-3}	440
6a	2.58×10^{-2}	2.60×10^{-2}	1
6b	5.45×10^{-2}	7.50×10^{-2}	0.73
6c	9.48×10^{-2}	7.49×10^{-2}	1
6d	7.20×10^{-2}	1.12×10^{-1}	0.64
7a	8.10	2.16×10^{-2}	375
7b	20.0	1.40×10^{-2}	1427
10a	1164	5.26×10^{-1}	2213
10b	9.60	8.16×10^{-3}	1176
10c	3.45×10^{-2}	3.13×10^{-2}	1

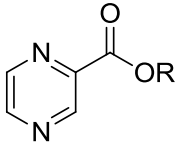
Observa-se que, para compostos com cadeias laterais lineares ou com uma ramificação (no primeiro ou no segundo carbono) a velocidade da hidrólise enzimática é bastante superior à hidrólise química, obtendo-se razões entre 2213 e 70. No que respeita a derivados com carbonos terciários junto ao grupo éster (duas ramificações no primeiro carbono da cadeia lateral), observa-se que as velocidades da hidrólise química e da hidrólise enzimática são bastante semelhantes, obtendo-se razões com valores aproximados de 1. Significa isto que estes derivados são extremamente estáveis à hidrólise enzimática efectuada pelas esterases existentes no plasma.

3.4. Estudos de actividade *in vitro*

As actividades dos ésteres derivados do POA foram testadas contra diferentes estirpes de micobactérias, *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG e ainda com *M. tuberculosis* H37Ra. Estes resultados encontram-se resumidos nos anexos I, II e III, sendo as actividades referidas em concentração mínima inibitória (CMI), em $\mu\text{g/mL}$ e em mM. Com base nos resultados obtidos nos referidos testes de actividade tentou-se estabelecer possíveis relações estrutura – actividade. Para isso relacionaram-se diferentes características estruturais com $p\text{CMI}$

(log[1/C]) para *M. tuberculosis* H37Ra. A actividade biológica normalmente representa-se como o logaritmo do inverso da concentração ou dose (log[1/C]) - **Tabela 14** (32, 58).

Tabela 14 – Resultados dos estudos de actividade *in vitro* para *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra



Concentração Mínima Inibitória
(CMI)

$pCMI \left(\log \frac{1}{CMI} \right)$

Composto	R	µg/mL	mM	
4a	C ₄ H ₉	100	0.515	0.288
4b	C ₅ H ₁₁	200	0.960	0.018
4c	C ₆ H ₁₃	50	0.225	0.648
4d	C ₇ H ₁₅	200	0.846	0.072
4e	C ₈ H ₁₇	50	0.200	0.700
4f	C ₉ H ₁₉	100	0.378	0.422
4g	C ₁₀ H ₂₁	25	0.090	1.047
5a	(CH ₃)CH ₃	200	1.20	-0.080
5b	(CH ₃)C ₂ H ₅	100	0.555	0.256
5c	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	100	0.450	0.347
(R)-5d	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	200	0.900	0.046
(S)-5e	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	100	0.450	0.347
5f	(CH ₃)C ₆ H ₁₃	100	0.423	0.373
5g	(CH ₃)C ₇ H ₁₅	50	0.200	0.700
5h	(CH ₃)C ₈ H ₁₇	<12.5	<0.047	<1.325
5i	(CH ₃)C ₁₀ H ₂₁	<12.5	<0.043	<1.369
6a	(CH ₃) ₂ CH ₃	200	1.11	-0.045
6b	(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅	200	1.03	-0.013
6c	(CH ₃) ₂ C ₃ H ₇	400	1.92	-0.283
6d	(CH ₃) ₂ C ₄ H ₉	200	0.900	0.046
6e	(CH ₃) ₂ C ₅ H ₁₁	200	0.846	0.072
7a	CH(CH ₃) ₂	100	0.555	0.256
7b	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	100	0.515	0.288
8a	C ₃ H ₆ CH(CH ₃) ₂	100	0.515	0.288
9a	C ₄ H ₈ Cl	100	0.466	0.332
10a	C ₆ H ₅	100	0.500	0.301
10b	C ₆ H ₁₀	100	0.485	0.314
10c	(CH ₃)C ₆ H ₁₀	200	0.908	0.042

Todos os derivados demonstram actividade contra *M. tuberculosis* H37Ra, sendo os compostos mais activos o **pirazinoato de 1-metilnonilo (5h)** e o **pirazinoato de 1-metilundecilo (5i)** com CMI's menores que 0.0473 mM e 0.0427 mM, respectivamente.

Os resultados dos testes de actividade *in vitro* mostram, até agora, que no geral, os compostos sintetizados são mais activos contra *M. tuberculosis* do que *M. smegmatis* ou *M. bovis* BCG. Esta diferença pode resultar do facto de a bomba de efluxo do *M. tuberculosis* ser menos eficiente, levando a maior acumulação de POA dentro da célula (23, 59).

IV - Relações estrutura-actividade

4. Relações estrutura-actividade

Neste capítulo pretende-se estabelecer a relação das características estruturais dos derivados sintetizados com a sua actividade contra *M. tuberculosis*. Em alguns casos serão também referidas relações entre as características estruturais e a estabilidade às enzimas plasmáticas, já que a estabilidade é fundamental para a actividade *in vivo*.

4.1. Efeito do comprimento da cadeia alquílica

O comprimento e a forma da cadeia lateral dos derivados sintetizados são elementos que podem fazer variar não só a actividade, como a estabilidade de determinado composto, uma vez que o resto da molécula permanece constante em todos os derivados.

Relativamente à análise da hidrólise enzimática por tipo de ramificação e número de carbonos da cadeia alquílica podem-se observar as seguintes relações apresentadas na **Figura 19**.

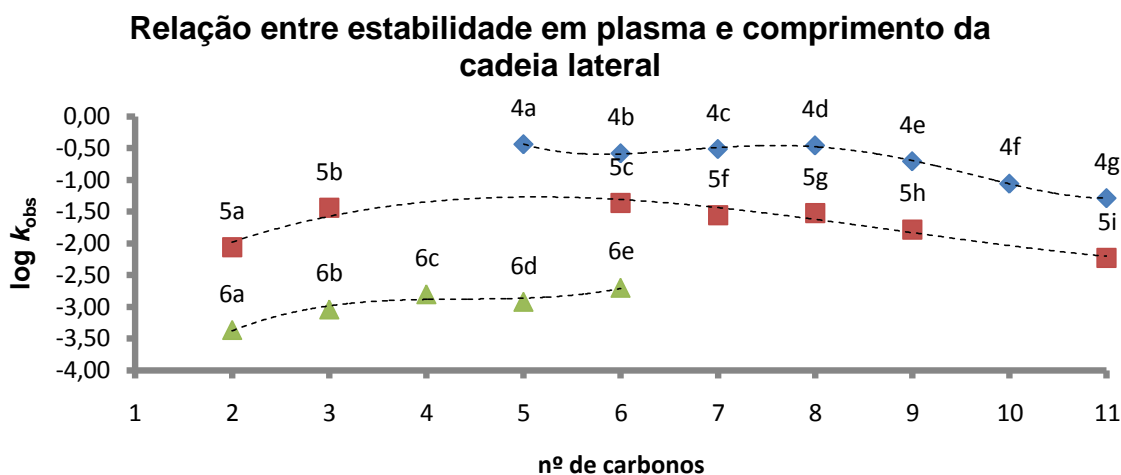


Figura 19 – Relação entre o comprimento da cadeia lateral e o valor de k_{obs} (plasma). (♦ - sem ramificações; ■ – com uma ramificação no primeiro carbono; ▲ – com duas ramificações no primeiro carbono)

Quando os ésteres possuem uma cadeia alquílica linear sem ramificações, observa-se que, de um modo geral, a estabilidade aumenta com o número de carbonos.

Para derivados com uma ramificação no carbono junto ao grupo éster observa-se que o gráfico apresenta uma forma semelhante a uma parábola invertida, contudo pouco pronunciada. Assim, os compostos mais estáveis são aqueles que apresentam menor e maior número de carbonos (2 e 11, respectivamente).

Quando existem duas ramificações no carbono junto ao grupo éster a relação que se observa é um pouco diferente. A estabilidade, de uma forma geral, diminui com o aumento da cadeia carbonada. A síntese de derivados com cadeias carbonadas mais longas, à semelhança dos derivados anteriores, poderia mostrar se a tendência deste grupo de compostos seria a mesma que a demonstrada para as cadeias alquílicas com uma ramificação.

A **Figura 20** representa as relações entre os vários grupos de derivados e a actividade contra *M. tuberculosis* H37Ra.

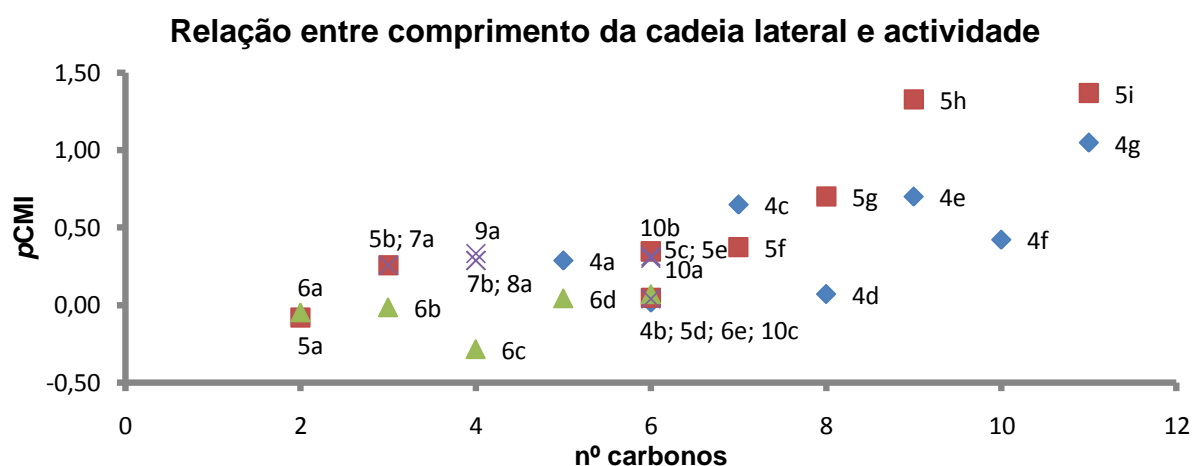


Figura 20 – Relação entre o comprimento da cadeia e o valor de pCMI para *M. tuberculosis* H37Ra ($y = 0,118x - 0,3652$) (♦ - sem ramificações; ■ – com uma ramificação no primeiro carbono; ▲ – com duas ramificações no primeiro carbono; X – restantes derivados).

De um modo geral, observa-se um aumento da actividade com o aumento do comprimento da cadeia carbonada lateral. Apesar de se verificar uma tendência geral, observa-se uma correlação moderada ($r^2 = 0,56$) (60). Verifica-se também que os compostos com 9 e 11 carbonos de comprimento na cadeia lateral, **5h** (pirazinoato de 1-metilnonilo), **4g** (pirazinoato de undecilo), **5i** (pirazinoato de 1-metilundecilo), são os mais activos contra *M. tuberculosis*.

Analisando estas mesmas variáveis (pCMI vs nº de carbonos) para os diferentes grupos de compostos indicados na **Figura 20** verificou-se que o único grupo de compostos em que se observou uma correlação foi o grupo dos derivados com uma ramificação no primeiro carbono da cadeia alquílica – **Figura 21**.

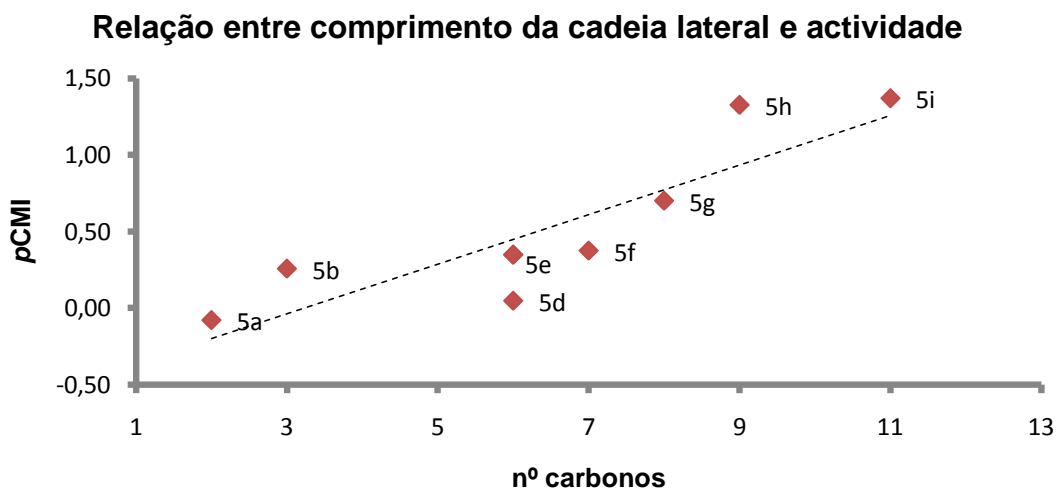


Figura 21 – Relação entre o comprimento da cadeia de derivados com uma ramificação no primeiro carbono da cadeia lateral e o valor de $pCMI$ para *M. tuberculosis* H37Ra ($y = 0,1618x - 0,5224$).

Neste tipo de derivados observa-se uma correlação ($r^2 = 0.76$) entre o aumento da actividade e o aumento do comprimento da cadeia carbonada (60).

4.2. Efeito da lipofilia do derivado

As propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas de um fármaco são cruciais, influenciando a sua solubilidade, absorção, distribuição, metabolismo e excreção (32, 61). O organismo humano pode ser visto de uma forma muito simplificada como composto por uma série de membranas que dividem compartimentos aquosos. Para atravessar estas membranas cujo interior formado por lípidos é extremamente hidrofóbico, a molécula deve ter propriedades hidrofóbicas (61). Moléculas demasiado polares ou hidrofílicas não atravessam as membranas celulares contudo, moléculas demasiado hidrofóbicas acumulam-se nos tecidos mais ricos em gordura, sendo pouco solúveis no plasma (61). Assim, é necessário encontrar um equilíbrio entre hidrofilia e lipofilia, de modo a que a molécula tenha propriedades adequadas ao seu uso *in vivo*.

O centro hidrofóbico de uma membrana pode ser simulado usando um solvente orgânico. De um modo semelhante, uma solução aquosa pode ser usada para mimetizar os compartimentos rodeados pelas membranas. Se o solvente orgânico não for miscível com a água, obtém-se um sistema com duas fases e assim pode-se estudar a preferência relativa de um composto para a fase aquosa (hidrofílico) ou para a fase orgânica

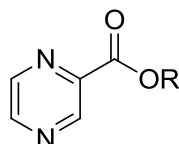
(hidrofóbico/lipofílico). Assim, para um composto orgânico, a sua lipofilia pode ser descrita em termos de coeficiente de partilha (P) ou log P como é geralmente expresso (32, 62).

O coeficiente de partilha define-se como a razão entre as concentrações do composto na sua forma não ionizada, em equilíbrio entre a fase orgânica e a fase aquosa (62). Compostos hidrofóbicos têm um valor de *P* elevado e os compostos hidrofílicos têm um valor baixo (32). Assim, log P é o logaritmo do coeficiente de partilha octanol/água de um composto, sendo um parâmetro útil para estabelecer relações estrutura actividade no desenvolvimento de fármacos (23).

De uma forma geral, a susceptibilidade do *M. tuberculosis* a ácidos fracos aumenta com o aumento do valor de log P dos compostos (23). Este facto, pode dever-se à maior facilidade de uma molécula mais lipofílica entrar na célula bacteriana. Sabe-se também que as micobactérias são naturalmente resistentes à maioria dos antibióticos mais usados, devido à pouca capacidade de os fármacos atravessarem a parede altamente hidrofóbica da micobactéria (59).

Pode ser observado, na **Tabela 15**, os valores de log P para cada um dos derivados.

Tabela 15 – Valores de log P calculados para todos os derivados sintetizados (63, 64).



Composto	R	log P (ALOGPS)
4a	C ₄ H ₉	1.79
4b	C ₅ H ₁₁	2.23
4c	C ₆ H ₁₃	2.77
4d	C ₇ H ₁₅	3.33
4e	C ₈ H ₁₇	3.88
4f	C ₉ H ₁₉	4.13
4g	C ₁₀ H ₂₁	4.47
5a	(CH ₃)CH ₃	0.65
5b	(CH ₃)C ₂ H ₅	1.21
5c	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	2.74
(R)-5d	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	2.74
(S)-5e	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	2.74
5f	(CH ₃)C ₆ H ₁₃	3.26
5g	(CH ₃)C ₇ H ₁₅	3.79
5h	(CH ₃)C ₈ H ₁₇	4.38
5i	(CH ₃)C ₁₀ H ₂₁	5.24
6a	(CH ₃) ₂ CH ₃	1.23
6b	(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅	1.75
6c	(CH ₃) ₂ C ₃ H ₇	2.21

Composto	R	log P (ALOGPS)
6d	(CH ₃) ₂ C ₄ H ₉	2.69
6e	(CH ₃) ₂ C ₅ H ₁₁	3.15
7a	CH(CH ₃) ₂	1.10
7b	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	1.87
8a	C ₃ H ₆ CH(CH ₃) ₂	1.87
9a	C ₄ H ₈ Cl	1.30
10a	C ₆ H ₅	1.32
10b	C ₆ H ₁₀	1.51
10c	(CH ₃)C ₆ H ₁₀	2.17

A relação da lipofilia com a estabilidade em plasma (hidrólise enzimática) é semelhante à relação entre a estabilidade e o número de carbonos da cadeia lateral alquílica, de acordo com o previsto – **Figura 22**.

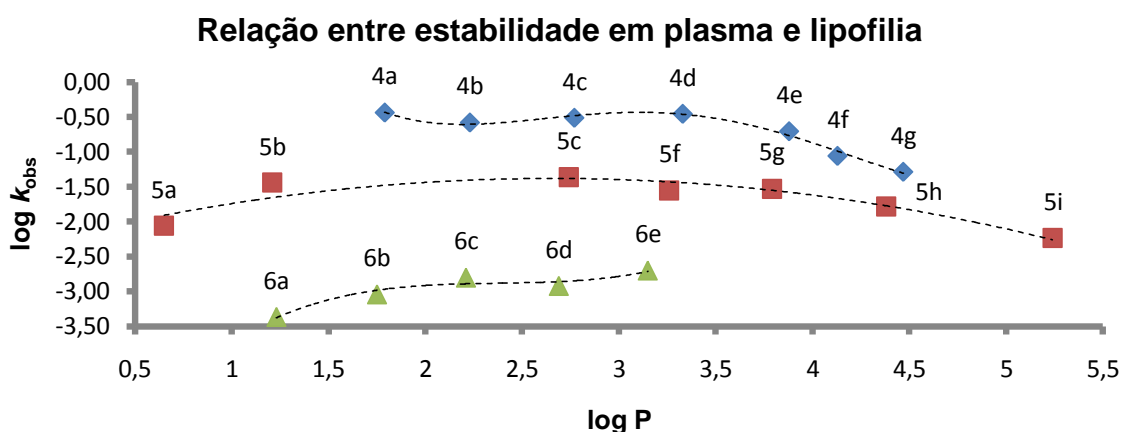


Figura 22 – Relação entre a lipofilia e o valor de k_{obs} (plasma). (◆ - sem ramificações; ■ – com uma ramificação no primeiro carbono; ▲ – com duas ramificações no primeiro carbono)

No que respeita à relação entre a lipofilia e a actividade pode-se observar as relações expressas na **Figura 23**.

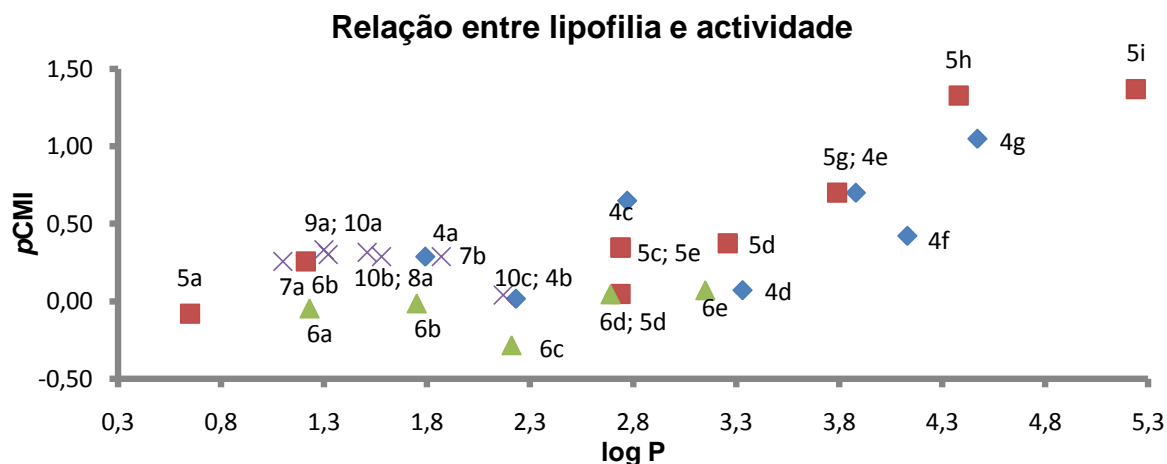


Figura 23 – Relação entre a lipofilia e o valor de pCMI para *M. tuberculosis* H37Ra ($y = 0,238x - 0,2671$) (♦ - sem ramificações; ■ – com uma ramificação no primeiro carbono; ▲ – com duas ramificações no primeiro carbono; X – restantes derivados).

À semelhança do que acontece na correlação entre comprimento da cadeia carbonada e actividade, verifica-se que, na generalidade, a actividade aumenta com o aumento da lipofilia, contudo com uma correlação pouco acentuada ($r^2 = 0.51$) (60). Os compostos que demonstram maior actividade são os mais lipofílicos, **5h**, pirazinoato de 1-metilnonilo (log P= 4.38), **4g**, pirazinoato de undecilo (log P= 4.47) e **5i** pirazinoato de 1-metilundecilo (log P= 5.24).

Para o grupo de compostos com uma ramificação no primeiro carbono, nos quais se incluem os dois compostos com maior actividade, observa-se uma maior correlação ($r^2 = 0.77$) entre lipofilia e actividade (**Figura 24**), do que para qualquer outro grupo de compostos (60).

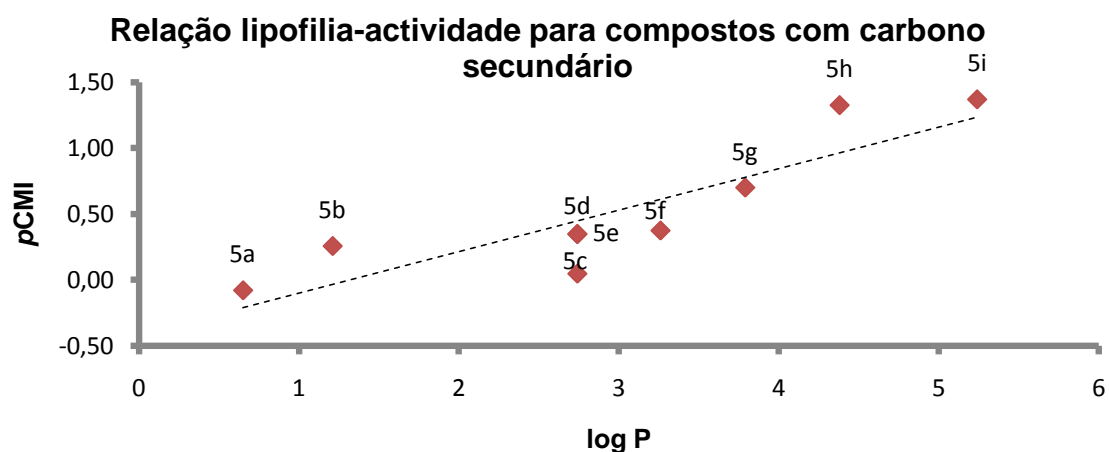


Figura 24 – Relação entre lipofilia de derivados com uma ramificação no primeiro carbono da cadeia lateral e o valor de pCMI para *M. tuberculosis* H37Ra ($y = 0,3153x - 0,417$).

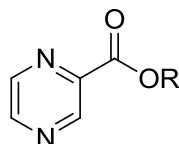
4.3. Efeito da Polaridade

A distribuição dos electrões na molécula de um fármaco tem uma influência considerável na distribuição e actividade do fármaco. Como referido anteriormente, um fármaco tem de atravessar diversas membranas biológicas de modo a atingir o seu local de acção (65). Como regra geral, grupos polares na sua forma não ionizada e grupos não polares são normalmente, mais facilmente transportados através das membranas. Adicionalmente, a distribuição dos electrões na sua estrutura influencia a forma como se dá a sua ligação com o seu alvo terapêutico, afectando a sua actividade (65).

O parâmetro de Taft, σ^* , mede quantitativamente a polaridade de um vasto número de substituintes alifáticos e aromáticos, tendo sido determinado a partir de velocidades de hidrólise de ésteres (66). Este parâmetro depende apenas da deslocação dos electrões (efeitos de polaridade) (66). σ^* é um parâmetro análogo à constante de Hammett (σ), contudo expressa por um símbolo diferente para enfatizar as suas diferentes origens (66).

Na **Tabela 16** pode observar-se os resultados deste parâmetro obtidos para diferentes derivados.

Tabela 16 – Valores do parâmetro de polaridade de Taft para os derivados sintetizados (67, 68).



Composto	R	σ^* (Taft)
4a	C ₄ H ₉	-0.23
4b	C ₅ H ₁₁	-0.25
4c	C ₆ H ₁₃	-0.17
4d	C ₇ H ₁₅	-0.15
4e	C ₈ H ₁₇	-0.15
4f	C ₉ H ₁₉	-0.112 ^{*1}
4g	C ₁₀ H ₂₁	-0.086 ^{*1}
5a	(CH ₃)CH ₃	-0.19
5b	(CH ₃)C ₂ H ₅	-0.19
5c	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	-0.18 ^{*2}
5f	(CH ₃)C ₆ H ₁₃	-0.18 ^{*2}
5g	(CH ₃)C ₇ H ₁₅	-0.18 ^{*2}
5h	(CH ₃)C ₈ H ₁₇	-0.17 ^{*2}
5i	(CH ₃)C ₁₀ H ₂₁	-0.17 ^{*2}
6a	(CH ₃) ₂ CH ₃	-0.3
6b	(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅	-0.33
6c	(CH ₃) ₂ C ₃ H ₇	-0.38 ^{*3}
6d	(CH ₃) ₂ C ₄ H ₉	-0.43 ^{*3}
6e	(CH ₃) ₂ C ₅ H ₁₁	-0.48 ^{*3}

Composto	R	σ^* (Taft)
7a	CH(CH ₃) ₂	-0.19
7b	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	—
8a	C ₃ H ₆ CH(CH ₃) ₂	-0.16
9a	C ₄ H ₈ Cl	0.06* ⁴
10a	C ₆ H ₅	0.6
10b	C ₆ H ₁₀	-0.18
10c	(CH ₃)C ₆ H ₁₀	-0.44

¹ - valores estimados com base na correlação $\sigma^=0,026n-0,372$ (n – número de carbonos) ($r^2=0,768$)

² - valores estimados com base na correlação $\sigma^=0,003n-0,202$ (n – número de carbonos) ($r^2=0,892$)

³ - valores estimados com base na correlação $\sigma^=0,047n-0,101$ (n – número de carbonos) ($r^2=0,983$)

*⁴ - valor estimado para a cadeia – (CH₂)₃CH₂Cl com base na expressão

$\sigma^* = (0,4)^3 \times 0,94$ em que: $\sigma^*(\text{CH}_2\text{Cl}) = 0,94$ e $\sigma^*(\text{CH}_2) = 0,4$

Para verificar se há uma relação entre o parâmetro de polaridade (σ^*) e a actividade *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Ra, colocaram-se os dados num gráfico, não se obtendo qualquer correlação – **Figura 25**.

Relação entre parâmetro de Taft (σ^*) e actividade

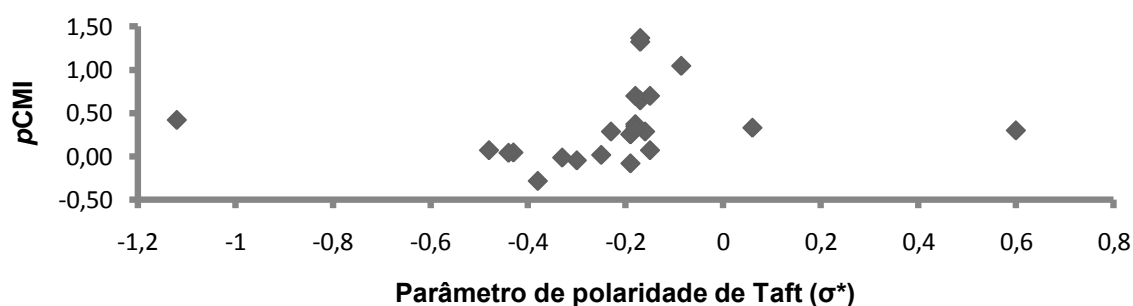


Figura 25 – Relação entre parâmetro de Taft (σ^*) e actividade *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Ra.

4.4. Efeito da estereoquímica da cadeia alquílica

O volume, o tamanho e a forma da molécula influenciam a maneira como o fármaco se aproxima e interage com o seu alvo (32). Assim, factores estereoquímicos são extremamente importantes não só nas interações ligando-receptor, assim como no transporte do fármaco (65). Um substituinte volumoso pode funcionar como um escudo e impedir uma interacção ideal entre o fármaco e o seu sítio de ligação. Alternativamente, um substituinte volumoso pode ajudar o fármaco a orientar-se para que a sua ligação seja

ótima e permita um aumento da actividade. Propriedades estereoquímicas são mais difíceis de quantificar do que propriedades hidrofóbicas ou electrónicas (32).

O parâmetro estereoquímico de Taft (E_s) foi a primeira tentativa para demonstrar uma relação entre um parâmetro mensurável relacionado com a forma e tamanho (volume) da molécula e a actividade (65, 69). O valor deste factor pode ser obtido comparando as taxas de hidrólise de ésteres alifáticos substituídos com as de um éster *standard*, em condições acídicas (32, 70).

$$E_s = \log \frac{k_{(XRCOOR')}}{k_{(RCOOR')}} = \log k_{(XRCOOR')} - \log k_{(RCOOR')}$$

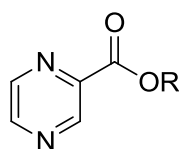
O parâmetro de Taft E_s é mais negativo para grupos maiores [$C(CH_3)_3$, CCl_3] e mais positivo para grupos mais pequenos (H, F, OH) (58).

Posteriormente foram criados mais parâmetros, como é o caso do parâmetro estereoquímico de Charton (E_{Sv}) e de Verloop e a refractividade molar (MR), entre outros (69, 70).

O parâmetro de Taft demonstrava algumas falhas, como por exemplo, os valores estarem disponíveis apenas para substituintes alquílicos, grupos derivados e hidrogénio. Tornou-se clara a necessidade uma nova abordagem para um maior progresso no tratamento quantitativo dos efeitos estereoquímicos. Esta nova abordagem foi proposta por Charton que sugeriu uma constante baseada no raio de van der Waals, considerada uma espécie de medida do tamanho do átomo. Os efeitos estereoquímicos podem surgir de repulsões entre átomos não ligados. Estas repulsões podem apenas resultar num aumento da energia de um grupo de átomos (71).

Na **Tabela 17** podem observar-se os valores obtidos para os parâmetros estereoquímicos de Charton, obtidos na literatura e a partir de deduções e equações de rectas.

Tabela 17 – Valores dos parâmetros estereoquímicos de Charton para os derivados sintetizados (67, 68).



Composto	R	E_{Sv} (Charton)
4a	C_4H_9	0.68
4b	C_5H_{11}	0.73
4c	C_6H_{13}	0.73
4d	C_7H_{15}	0.68

Composto	R	E_{sv} (Charton)
4e	C ₈ H ₁₇	0.68
4f	C ₉ H ₁₉	—
4g	C ₁₀ H ₂₁	0.68
5a	(CH ₃)CH ₃	0.76
5b	(CH ₃)C ₂ H ₅	1.02
5c	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	1.56
5f	(CH ₃)C ₆ H ₁₃	1.76* ¹
5g	(CH ₃)C ₇ H ₁₅	1.96* ¹
5h	(CH ₃)C ₈ H ₁₇	2.15* ¹
5i	(CH ₃)C ₁₀ H ₂₁	2.54* ¹
6a	(CH ₃) ₂ CH ₃	1.24
6b	(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅	1.63
6c	(CH ₃) ₂ C ₃ H ₇	2.02* ²
6d	(CH ₃) ₂ C ₄ H ₉	2.41* ²
6e	(CH ₃) ₂ C ₅ H ₁₁	2.8* ²
7a	CH(CH ₃) ₂	0.98
7b	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	1.00
8a	C ₃ H ₆ CH(CH ₃) ₂	0.68
9a	C ₄ H ₈ Cl	—
10a	C ₆ H ₅	0.57
10b	C ₆ H ₁₀	0.87
10c	(CH ₃)C ₆ H ₁₀	2.41* ²

*¹ valores estimados com base na correlação $E_{sv}=0,195n+0,201$ (n – número de carbonos) ($r^2=0,99$)

*² valores estimados $E_{sv}=0,39n-0,32$ (n – número de carbonos) ($r^2=1$) (56, 68)

Para verificar se há uma relação entre o parâmetro de estereoquímica (E_{sv}) e a actividade *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Ra, colocaram-se os dados num gráfico, não se obtendo qualquer correlação – **Figura 26**.

Relação entre parâmetro de Charton (E_{sv}) e actividade

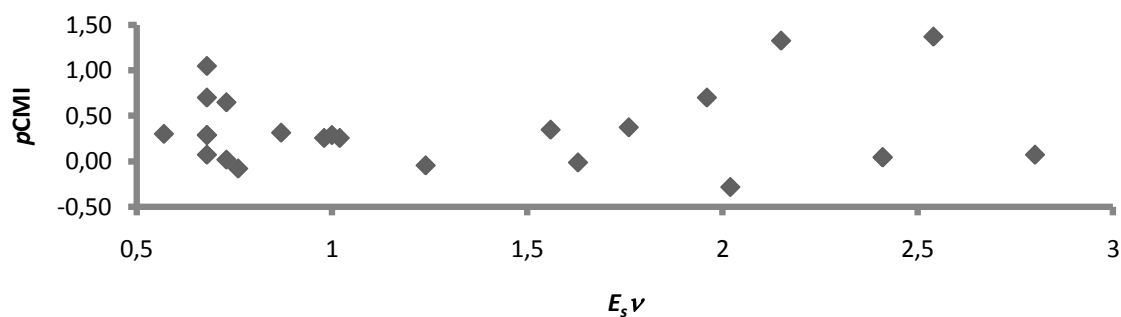


Figura 26 – Relação entre parâmetro de Charton (E_{sv}) e actividade *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Ra.

4.5. Correlações entre estabilidade, actividade e os diversos descritores moleculares

Fizeram-se diversas correlações entre os descritores moleculares obtidos e o valor de $\log k_{obs}$ em plasma, não se tendo obtido boas correlações (60).

$$\log k_{obs} \text{ vs } \log P \quad \log k_{obs} = 0.071 (\pm 0.17) \log P - 1.84 (\pm 0.47) \\ (n=25) (r^2 = 0.00774) (s = 0.97)$$

$$\log k_{obs} \text{ vs } \sigma^* \quad \log k_{obs} = 1.3 (\pm 0.98) \sigma^* - 1.4 (\pm 0.32) \\ (n=25) (r^2 = 0.0711) (s = 0.94)$$

$$\log k_{obs} \text{ vs } E_s \nu \quad \log k_{obs} = -0.90 (\pm 0.21) E_s \nu + 0.41 (\pm 0.32) \\ (n=25) (r^2 = 0.44) (s = 0.73)$$

n – número de amostras, r^2 – coeficiente de correlação, s – erro padrão

Apesar dos baixos coeficientes de correlação, o parâmetro que parece ter mais influência na estabilidade é o parâmetro estereoquímico de Charton ($E_s \nu$). Quando se tentou fazer uma correlação linear entre todos os parâmetros e $\log k_{obs}$, obteve-se a seguinte expressão:

$$\log k_{obs} = 0.37 (\pm 0.12) \log P - 1.03 (\pm 0.78) \sigma^* - 1.3 (\pm 0.23) E_s \nu - 1.02 (\pm 0.34) \\ (n=25) (r^2 = 0.63) (s = 0.62)$$

n – número de amostras, r^2 – coeficiente de correlação, s – erro padrão

Contudo, obteve-se um melhor coeficiente de correlação quando se fez uma correlação multiparamétrica:

$$\log k_{obs} = 1.75 (\pm 0.263) \log P - 0.369 (\pm 0.053) (\log P)^2 + 3.54 (\pm 0.663) \sigma^* - 14.5 (\pm 1.79) (\sigma^*)^2 \\ - 4.94 (\pm 0.671) E_s \nu + 1.67 (\pm 0.257) (E_s \nu)^2 + 1.42 (\pm 0.555)$$

(n = 25) ($r^2 = 0.92$) (s = 0.30), em que n – número de amostras, r^2 – coeficiente de correlação, s – erro padrão

Assim, verifica-se que a hidrólise em plasma dos ésteres derivados do POA não depende de um único factor mas de todos em conjunto – lipofilia, polaridade e efeitos estereoquímicos.

No que respeita às relações entre os diversos descritores e actividade observa-se uma situação semelhante.

$$pCMI \text{ vs } \log P \quad pCMI = 0.27 (\pm 0.05) \log P - 0.35 (\pm 0.14) \\ (n=25) (r^2 = 0.56) (s = 0.29)$$

$$pCMI \text{ vs } \sigma^* \quad pCMI = 0.60 (\pm 0.43) \sigma^* + 0.46 (\pm 0.12) \\ (n=25) (r^2 = 0.076) (s = 0.41)$$

$$pCMI \text{ vs } E_s \nu \quad pCMI = 0.049 (\pm 0.12) E_s \nu + 0.27 (\pm 0.19) \\ (n=25) (r^2 = 0.068) (s = 0.43)$$

n – número de amostras, r^2 – coeficiente de correlação, s – erro padrão

Observou-se que o parâmetro que mais influencia a actividade é o log P. Este resultado poderá estar relacionado com o facto de uma maior lipofilia permitir uma entrada mais fácil do composto na célula da micobactéria. Na correlação linear entre todos os parâmetros e pCMI, foi obtida a seguinte expressão:

$$pCMI = 0.28 (\pm 0.050) \log P + 0.59 (\pm 0.32) \sigma^* - 0.056 (\pm 0.097) E_s \nu - 0.21 (\pm 0.14) \\ (n=25) (r^2 = 0.67) (s = 0.26)$$

n – número de amostras, r^2 – coeficiente de correlação, s – erro padrão

Quando relacionamos σ^* e E_s de forma quadrática e ainda log P de uma forma linear com a actividade *in vitro*, obtém-se uma expressão com maior coeficiente de correlação.

$$pCMI = - 0.456 (\pm 0.374) E_s \nu + 0.226 (\pm 0.136) (E_s \nu)^2 + 1.46 (\pm 0.337) \sigma^* \\ - 3.41 (\pm 0.904) (\sigma^*)^2 + 0.094 (\pm 0.057) \log P + 0.723 (\pm 0.352)$$

(n = 25) ($r^2 = 0.79$) (s = 0.19), em que n – número de amostras, r^2 – coeficiente de correlação, s – erro padrão

Após análise das correlações obtidas é interessante realçar que o parâmetro que mais afecta a estabilidade é o parâmetro estereoquímico. Contudo, a actividade não é tão afectada pelo parâmetro estereoquímico, sendo o log P o parâmetro com mais influência na actividade. Este é um dado importante que pode ser usado no desenho e desenvolvimento de novos derivados do POA.

4.6. Estabilidade em plasma humano e actividade

Diversos pró-fármacos do ácido pirazinóico demonstraram actividade antimicobacteriana anteriormente (18, 46, 48). No entanto, os pró-fármacos mais promissores apresentavam baixa estabilidade em plasma, não tendo sido desenvolvidos ésteres do POA que além de serem activos fossem estáveis em plasma (49).

Para que estes pró-fármacos sejam úteis não é apenas necessário que possuam actividade contra o agente infeccioso. É fundamental que sejam resistentes à hidrólise pelas esterases humanas, como é o caso das enzimas com actividade esterásica existentes no plasma. A concepção destes pró-fármacos pretende que estes sejam resistentes à hidrólise pelas esterases do organismo, de modo a atingirem a micobactéria intactos, permitindo-lhes entrar na célula micobacteriana. Ao entrarem na micobactéria é necessário que as esterases deste microrganismo consigam hidrolisar o pró-fármaco transformando-o no fármaco activo. Todos os ésteres sintetizados demonstraram actividade contra *M. tuberculosis* H37Ra, sendo que apenas um, o pirazinoato de 1,1-dimetilbutilo (6c), apresentou menor actividade que a PZA.

Assim, é importante verificar se os compostos com maior actividade são suficientemente estáveis para que tenham interesse terapêutico – **Tabela 18**.

Tabela 18 – Estabilidade em plasma e a concentrações mínimas inibitórias dos compostos mais activos para *M. tuberculosis* H37Ra.

Composto	Nome	(10 ³ x) k_{obs}/min^{-1}	CMI/mM
4g	Pirazinoato de undecilo	51.3 ± 0.534	0.090
5h	Pirazinoato de 1-metilnonilo	16.5 ± 0.366	<0.047
5i	Pirazinoato de 1-metilundecilo	5.87 ± 0.530	<0.043

Verifica-se que os compostos com actividade mais significativa contra *M. tuberculosis* apresentam valores de k_{obs} de 51.3 min⁻¹, 16.5 min⁻¹ e 5.87 min⁻¹, que correspondem a tempos de semi-vida de 20, 61 e 170 min, respectivamente. Assim, observa-se que os compostos mais activos possuem alguma resistência à hidrólise por esterases plasmáticas.

Relativamente aos compostos mais estáveis, cujo valor de k_{obs} da hidrólise observada em plasma é da mesma ordem de grandeza que valor observado em tampão fosfato pH 7.4, observa-se que possuem actividade contra *M. tuberculosis* H37Ra (**Tabela 19**), sendo quase todos mais activos que a PZA (CMI = 1.62 mM) e POA (CMI = 3.22 mM), à excepção do composto **6c** (Anexo III).

Tabela 19 – Estabilidade em plasma e a concentrações mínimas inibitórias obtidas para *M. tuberculosis* H37Ra dos compostos mais estáveis em plasma.

Composto	Nome	(10³x) k_{obs}/min^{-1}	CMI/mM
6a	Pirazinoato de <i>terc</i> -butilo	$0.430 \pm 2.03 \times 10^{-02}$	1.11
6b	Pirazinoato de 1,1-dimetilpropilo	$0.908 \pm 4.16 \times 10^{-02}$	1.03
6c	Pirazinoato de 1,1-dimetilbutilo	$1.58 \pm 4.02 \times 10^{-02}$	1.92
6d	Pirazinoato de 1,1-dimetilpentilo	$1.20 \pm 1.98 \times 10^{-02}$	0.900
10c	Pirazinoato de 1-metilciclo-hexilo	$0.575 \pm 4.82 \times 10^{-03}$	0.908

É importante realçar que a actividade da PZA, como referido anteriormente, depende do pH. Os estudos de actividade *in vitro* em *M. tuberculosis* H37Ra foram feitos a pH 6.5, contudo a pirazinamida necessita de um pH mais baixo (cerca de 5.5) para exibir uma actividade mais notável (22, 72). Se assumirmos que o mecanismo de acção dos ésteres do POA é semelhante ao da pirazinamida (como será expectável), um pH mais baixo seria mais favorável para o cálculo das CMI's. Porém uma das dificuldades de testar a actividade da PZA e seus derivados está relacionada com o pH, uma vez que o pH 5.5 inibe o crescimento das células micobacterianas (72).

V – Conclusão

5. Conclusão

Na síntese de derivados do POA foram utilizados dois métodos, o método A e o método B. O método A consiste na reacção do cloreto de ácido com o álcool na presença de uma base enquanto no método B se gera primeiro o ião alcóxido fazendo-o reagir de seguida com o cloreto de ácido. Observou-se que para a síntese de ésteres do POA com cadeia alquílica lateral linear ou com ramificação no último carbono o método A era eficaz e que após os dois passos reaccionais se obtinham rendimentos entre os 44 e os 76%. Para derivados com uma ramificação no primeiro carbono da cadeia alquílica observou-se que os rendimentos obtidos com o método A são baixos, na ordem dos 20%, conseguindo-se melhorar os rendimentos utilizando o método B, com rendimentos entre os 36 e 76%. Verifica-se assim, que a formação do alcóxido e a sua adição ao cloreto de ácido é um melhor método para a síntese de derivados a partir de álcoois com algum impedimento estereoquímico. Apesar desta melhoria, os derivados cujo primeiro carbono da cadeia alquílica é um carbono terciário apresentam rendimentos muito baixos, na ordem dos 20%. Uma vez que os derivados que possuem um carbono terciário junto à função éster são os mais resistentes à hidrólise pelas proteínas plasmáticas será importante encontrar um método de síntese mais adequado, de forma a obter rendimentos mais altos.

É muito importante que os pró-fármacos do POA sejam estáveis em plasma, por outro lado, para que os pró-fármacos tenham actividade, é indispensável que o pró-fármaco entre na micobactéria e seja activado no seu interior. Concluiu-se que o impedimento estereoquímico no primeiro carbono da cadeia alquílica é fundamental para o aumento da estabilidade em plasma, tendo-se observado dois grupos de compostos. O primeiro, com uma ramificação, com menor estabilidade que o segundo, duas ramificações.

Apesar da estabilidade plasmática razoável todos compostos demonstram actividade contra *M. tuberculosis* H37Ra, demonstrando que embora sejam bastantes resistentes à hidrólise pelas enzimas plasmáticas, conseguem entrar na célula do *M. tuberculosis*, sendo activados no seu interior, como pretendido.

Os derivados **pirazinoato de *terc*-butilo (6a)**, **pirazinoato de 1,1-dimetilpropilo (6b)**, **pirazinoato de 1,1-dimetilpentilo (6d)** e **pirazinoato de 1-metilciclo-hexilo (10c)** apresentam tempos de semi-vida em plasma de aproximadamente 27, 13, 10 e 20 h, respectivamente. As suas CMI's nos estudos de actividade *in vitro* feitos para *M. tuberculosis* H37Ra foram inferiores às obtidas, nas mesmas condições para o POA e para a PZA, sendo assim compostos bastante promissores.

Os derivados mais activos são o **pirazinoato de 1-metilnonilo (5h)** e o **pirazinoato de 1-metilundecilo (5i)** com CMI's menores que 47.3 μM e 42.7 μM , respectivamente. O único derivado que apresenta valores de CMI nesta ordem de grandeza (μM) é o **pirazinoato de undecilo (4g)** com uma CMI de 90 μM . É fundamental realçar que o derivado mais activo, **pirazinoato de 1-metilundecilo (5i)**, apresenta um tempo de semi-vida em plasma de 2 h, sendo também um composto com bastante interesse para estudos futuros.

Novos estudos no âmbito da estabilidade e activação destes derivados do POA são fundamentais. Em primeiro lugar é necessário verificar as velocidades de hidrólise pelas enzimas hepáticas de modo a confirmar a sua estabilidade e a sua consequente adequabilidade a humanos. Em segundo lugar, é fundamental avaliar as velocidades de hidrólise dos derivados sintetizados em homogenato de micobactéria, de modo a analisar a capacidade das esterases e lipases deste microorganismo em activar os pró-fármacos do POA. Como comprovado pelos bons resultados dos estudos de actividade, o facto de todos os pró-fármacos sintetizados demonstrarem actividade *in vitro*, mostra que as esterases das micobactérias conseguem activá-los. Contudo, os estudos de activação dos pró-fármacos são importantes para observar as velocidades de hidrólise, avaliando, deste modo, quais os pró-fármacos que são mais facilmente activados pelas esterase de micobactérias, permitindo o desenvolvimento de novos pró-fármacos do POA.

Em suma, pode afirmar-se que o objectivo principal deste trabalho foi alcançado com sucesso, tendo-se conseguido sintetizar compostos estáveis à hidrólise pelas proteínas plasmáticas sem prejudicar a sua actividade *in vitro*.

VI - Procedimento experimental

6. Procedimento experimental

Todo o trabalho experimental realizado envolveu vários procedimentos gerais, que seguidamente serão apresentados.

6.1. Equipamento e material

Para a cromatografia em camada fina (CCF), utilizada para seguir a evolução das reacções, utilizaram-se folhas de alumínio com sílica gel F254 (*Merck*) com espessura de 0.25 mm. A revelação dos cromatogramas foi alcançada por irradiação de luz ultravioleta (UV) a 254 nm.

A cromatografia em coluna foi utilizada para isolar e purificar os compostos sintetizados. Utilizaram-se colunas de vidro de tamanho variável, com enchimento constituído por sílica *Kieselgel 60 (Merck)* de granulometria 0.063 - 0.200 mm.

Os espectros de IV foram registados num aparelho Impact 400, Nicolet Instrument Corporation. São apresentadas apenas as frequências correspondentes às bandas características dos grupos carbonilo. Os dados obtidos encontram-se apresentados pela seguinte ordem: frequência máxima de absorção ($\nu_{\text{máx.}}$ em cm^{-1}); tipo de banda (f- forte ou l- larga); atribuição a um grupo de átomos na molécula.

Os espectros de RMN foram obtidos num espectrómetro Bruker AMX-400 (400Hz) na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. Os desvios são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Utilizou-se tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os dados obtidos encontram-se indicados pela seguinte ordem: Núcleo (solvente): desvio químico (δ , ppm) [multiplicidade do sinal (s- singuleto, s/- singuleto largo, d- duplete, t- tripleto, q- quadruplete, m- multiplete), constante de acoplamento (J , em Hertz), intensidade relativa (nH, como número de prótons), atribuição na molécula]. Foram obtidos espectros de ^1H e ^{13}C para a atribuição das estruturas dos compostos.

O ponto de fusão (p.f.) foi determinado num aparelho de placa aquecida Bock monoscope M.

O espectro de massa de baixa resolução foi obtido num espectrómetro de massa triplo quadrupolo, efectuados no Laboratório de Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massa da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Os dados obtidos encontram-se indicados pela seguinte ordem: razão massa/carga (m/z); atribuição do ião molecular $[\text{M}+\text{Na}]^+$; intensidade do pico relativa à do pico base (%).

Os estudos de HPLC foram realizados num cromatógrafo *Merck*, constituído por uma bomba *Merck – Hitachi* L-7100, um detector *Merck – Hitachi* UV L-7400, um injector automático *Merck – Hitachi* AS-2000 e um integrador *Merck – Hitachi* D-2500. A coluna usada foi LiCroCART® RP-18 com partículas com partículas de 5 µm.

6.2. Reagentes e solventes

Os solventes usados foram adquiridos comercialmente aos seguintes fornecedores: Valente e Ribeiro Lda; José Manuel Gomes dos Santos Lda. Aquando a sua indicação nos procedimentos experimentais foi destilado e purificado segundo a literatura (73).

Os reagentes utilizados foram adquiridos comercialmente e utilizados sem purificação. Os seus fornecedores foram: Panreac®, Sigma-Aldrich®, Fluka®, Merck® e BDH®.

6.3. Síntese de derivados do ácido pirazinóico

A síntese de derivados do POA fez-se, de uma forma geral, em dois passos reaccionais, a síntese do cloreto de ácido e a sua adição ao respectivo álcool.

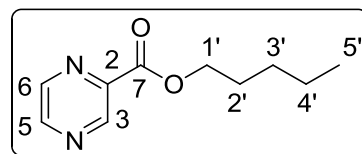
6.3.1. Pirazinoato de pentilo (4a)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 10 mL de diclorometano seco e 22.46 mmoles (2.44 mL, 1 eq.) de pentanol. De seguida adicionaram-se 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 65 h, tendo-se seguido a evolução da reacção através de CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:3), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

$\eta = 72 \%$

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.31 (*d*, *J*=1.33 Hz, 1H, C₃-H), 8.76 (*d*, *J*=2.34 Hz, 1H, C₆-H), 8.74 (*m*, 1H, C₅-H), 4.44 (*t*, *J*=6.85 Hz, 2H, C₁-H), 1.83 (*m*, 2H, C₂-H), 1.41 (*m*, 4H, C₃-H/C₄-H), 0.92 (*t*, *J*=7.06 Hz, 3H, C₅-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 164.06 (C₇), 147.64 (C₂), 146.33 (C₃), 144.57 (C₆), 143.72 (C₅), 66.62 (C₁), 28.40 (C₂), 28.09 (C₃), 22.42 (C₄), 14.05 (C₅)

I.V. (filme) ν_{máx}: 1722.43 cm⁻¹ (f, C=O)

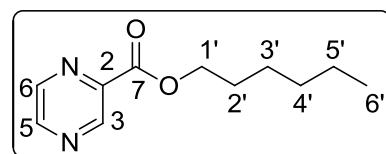
6.3.2. Pirazinoato de hexilo (4b)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (2.80 mL, 1 eq.) de hexanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 7h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

η= 67 %

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.34 (*d*, *J*=1.36 Hz, 1H, C₃-H), 8.79 (*d*, *J*=2.35 Hz, 1H, C₆-H), 8.76 (*m*, 1H, C₅-H), 4.47 (*t*, *J*=6.91 Hz, 2H, C₁-H), 1.85 (*m*, 2H, C₂-H), 1.47 (*m*, 2H, C₃-H), 1.36 (*m*, 4H, C₄-H /C₅-H), 0.92 (*t*, *J*=6.88 Hz, 3H, C₆-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 164.01 (C₇), 147.58 (C₂), 146.29 (C₃), 144.48 (C₆), 143.65 (C₅), 66.55 (C₁), 31.42 (C₂), 28.57 (C₃), 25.56 (C₄), 22.53 (C₅) 14.01 (C₆)

I.V. (filme) ν_{máx}: 1722.86 cm⁻¹ (f, C=O)

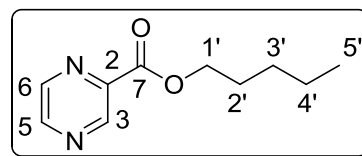
6.3.3. Pirazinoato de heptilo (4c)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (3.24 mL, 1 eq.) de heptanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 11 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração laranja.

$\eta = 56\%$

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.31 (*d*, *J*=1.26 Hz, 1H, C₃-H), 8.77 (*d*, *J*=2.35 Hz, 1H, C₆-H), (*d*, *J*=1.26 Hz, 1H, C₅-H) 4.45 (*t*, *J*=6.93 Hz, 2H, C₁-H), 1.83 (*m*, 2H, C₂-H), 1.45, (*m*, 2H, C₃-H), 1.32 (*m*, 6H, C₄-H / C₅-H / C₆-H), 0.88 (*t*, *J*=6.77 Hz, 3H, C₇-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 163.98 (C₇), 147.57 (C₂), 146.26 (C₃), 144.47 (C₆), 143.62 (C₅), 66.53 (C₁), 31.68 (C₂), 28.90 (C₃), 28.59 (C₄), 25.83 (C₅), 22.56 (C₆), 14.06 (C₇)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1723.12 cm⁻¹ (f, C=O)

6.3.4. Pirazinoato de octilo (4d)

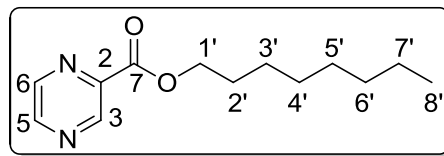
Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (3.52 mL, 1 eq.) de octanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 4h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior

utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

$\eta = 44 \%$

$^1\text{H-RMN } \delta$ (400 MHz, CDCl_3): 9.33 (*d*, $J=1.29$ Hz, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 8.78 (*d*, $J= 2.38$ Hz, 1H, $\text{C}_6\text{-H}$), 8.76 (*m*, 1H, $\text{C}_5\text{-H}$), 4.46 (*t*, $J=6.84$ Hz, 2H, $\text{C}_{1'}\text{-H}$), 1.84 (*m*, 2H, $\text{C}_{2'}\text{-H}$), 1.46 (*m*, 2H, $\text{C}_{3'}\text{-H}$), 1.33 (*m*, 8H, $\text{C}_{4'}\text{-H} / \text{C}_{5'}\text{-H} / \text{C}_{6'}\text{-H} / \text{C}_{7'}\text{-H}$), 0.89 (*t*, 3H, $J=6.83$ Hz, $\text{C}_{8'}\text{-H}$)



$^{13}\text{C-RMN } \delta$ (100 MHz, CDCl_3): 163.98 (C_7), 147.56 (C_2), 146.26 (C_3), 144.46 (C_6), 143.63 (C_5), 66.55 ($\text{C}_{1'}$), 31.73 ($\text{C}_{2'}$), 29.70 ($\text{C}_{3'}$), 29.18 ($\text{C}_{4'}$), 28.60 ($\text{C}_{5'}$), 25.88 ($\text{C}_{6'}$), 22.63 ($\text{C}_{7'}$), 14.09 ($\text{C}_{8'}$)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1723.95 cm^{-1} (f, C=O)

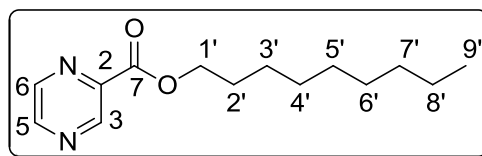
6.3.5. Pirazinoato de nonilo (**4e**)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (3.99 mL, 1 eq.) de nonanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C . Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 20 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

$\eta = 76 \%$

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.32 (s, 1H, C₃-H), 8.78 (d, *J*=2.37 Hz, 1H, C₆-H), 8.75 (sl, 1H, C₅-H), 4.46 (t, *J*=6.85 Hz, 2H, C₁-H), 1.84 (q, *J*=6.85 Hz, *J*=7.34 Hz, 2H, C₂-H), 1.34 (m, 10H, C₃-H /C₄-H



/C₅-H/C₆-H/C₇-H/C₈-H), 0.88 (t, *J*=6.73 Hz, 3H, C₉-H)

¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 164.00 (C₇), 147.58 (C₂), 146.28 (C₃), 144.47 (C₆), 143.64 (C₅), 66.55 (C₁), 31.84 (C₂), 29.45 (C₃), 29.24 (C₄), 29.22 (C₅), 28.60 (C₆), 25.87 (C₇), 22.65 (C₈), 14.11 (C₉)

I.V. (filme) ν_{máx}: 1724.17 cm⁻¹ (f, C=O)

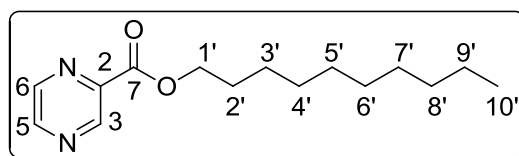
6.3.6. Pirazinoato de decilo (4f)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (4.29 mL, 1 eq.) de decanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 17 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

η = 57 %

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.33 (d, *J*=1.45 Hz, 1H, C₃-H), 8.79 (d, *J*=2.44 Hz, 1H, C₆-H), 8.76 (dd, *J*=1.45 Hz, 1H, C₅-H), 4.47 (t, *J*=6.88 Hz, 2H, C₁-H), 1.85 (m, *J*=6.88 Hz, *J*=7.47 Hz, 2H, C₂-H),



1.28 (m, 14H, C₃-H/C₄-H/C₅-H/C₆-H/C₇-H/C₈-H/C₉-H), 0.89 (t, *J*=7.05 Hz, 3H, C₁₀-H)

¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 164.00 (C₇), 147.58 (C₂), 146.29 (C₃), 144.47 (C₆), 143.65 (C₅), 66.56 (C₁), 62.34 (C₂), 31.88 (C₃), 29.51 (C₄), 29.30 (C₅), 29.24 (C₆), 28.60 (C₇), 25.8 (C₈), 22.68 (C₉), 14.12 (C₁₀)

I.V. (filme) ν_{máx}: 1723.46 cm⁻¹ (f, C=O)

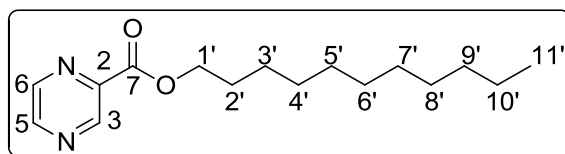
6.3.7. Pirazinoato de undecilo (**4g**)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (3.91 mL, 1 eq.) de undecanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 14 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela clara.

$\eta = 63\%$

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.33 (*d*, $J=1.07$ Hz, 1H, C₃-H), 8.78 (*d*, $J=2.30$ Hz, 1H, C₆-H), 8.75 (*m*, 1H, C₅-H), 4.46 (*t*, $J=6.82$ Hz, 2H, C₁-H), 1.84 (*q*, $J=6.82$ Hz, $J=7.35$ Hz, 2H, C₂-H), 1.45 (*m*, 2H, C₃-H), 1.32 (*m*, 14H, C₃-H / C₄-H / C₅-H / C₆-H / C₇-H / C₈-H / C₉-H / C₁₀-H) 0.88 (*t*, $J=6.82$ Hz, 3H, C₁₁-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 164.00 (C₇), 147.58 (C₂), 146.28 (C₃), 144.47 (C₆), 143.64 (C₅), 66.55 (C₁'), 31.90 (C₂'), 29.59 (C₃'), 29.56 (C₄'), 29.49 (C₅'), 29.32 (C₆'), 29.24 (C₇'), 28.60 (C₈'), 25.88 (C₉'), 22.68 (C₁₀'), 14.13 (C₁₁')

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1724.06 cm⁻¹ (f, C=O)

6.3.8. Pirazinoato de isopropilo (**5a**)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (1.73 mL, 1 eq.) de iso-propanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 35 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

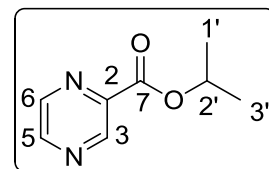
Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:5). Fez-se uma segunda coluna para separar uma das fracções obtidas na primeira coluna usando como eluente hexano:acetato de etilo 1:3, tendo-se obtido um óleo com coloração castanha.

$\eta = 20\%$

$^1\text{H-RMN } \delta$ (400 MHz, CDCl_3): 9.28 (sl, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 8.72 (m, 2H, $\text{C}_5\text{-H}$ / $\text{C}_6\text{-H}$), 5.35 (q, $J=6.25$ Hz, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$), 1.41 (d, $J=6.25$ Hz, 6H, $\text{C}_1\text{-H}$ / $\text{C}_3\text{'-H}$)

$^{13}\text{C-RMN } \delta$ (100 MHz, CDCl_3): 163.45 (C_7), 147.45 (C_2), 146.25 (C_3), 144.40 (C_6), 143.90 (C_5), 70.24 (C_1), 21.43 (C_2 / C_3)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1718.60 cm^{-1} (f, C=O)



6.3.9. Pirazinoato de *sec*-Butilo (5b)

6.3.9.1. Síntese de pirazinoato de *sec*-butilo via método A

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (1.34 mL, 1 eq.) de *sec*-butanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 18 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

$\eta = 21\%$

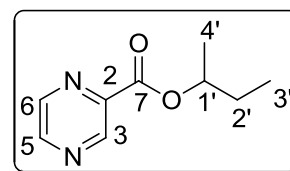
6.3.9.2. Síntese de pirazinoato de sec-butilo via método B

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (1.34 mL, 1 eq.) de sec-butanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, com formação de um sólido branco. Adicionou-se 13 mL de diclorometano e de seguida o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação. De seguida colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 18 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Filtrou-se por vácuo, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

$\eta = 38\%$

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.33 (*d*, *J*=1.11 Hz, 1H, C₃-H), 8.77 (*m*, 2H, C₅-H/C₆-H), 5.24 (*m*, 1H, C₁-H), 1.86 (*m*, 1H, C₂-H_a), 1.75 (*m*, 1H, C₂-H_b), 1.43 (*d*, *J*=6.25 Hz, 3H, C₄-H), 1.01 (*t*, *J*=7.38 Hz, 3H, C₃-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 163.61 (C₇), 147.45 (C₂), 146.26 (C₃), 144.48 (C₆), 143.95 (C₅), 74.82 (C₁), 28.81 (C₃), 19.52 (C₄), 9.85 (C₃)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1718.52 cm⁻¹ (f, C=O)

6.3.10. Pirazinoato de 1-metil-hexilo (5c)

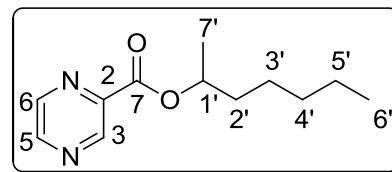
Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (3.26 mL, 1 eq.) de 2-heptanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, com formação de um sólido branco. Adicionou-se 13 mL de diclorometano e de seguida o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação. De seguida colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 21 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Filtrou-se por vácuo, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com

sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 3:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

η = 58 %

$^1\text{H-RMN } \delta$ (400 MHz, CDCl_3): 9.31 (*sl*, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 8.76 (*dl*, 2H, $\text{C}_5\text{-H}/\text{C}_6\text{-H}$), 5.29 (*m*, 1H, $\text{C}_1\text{-H}$), 1.82 (*m*, 1H, $\text{C}_2\text{-H}_a$), 1.67 (*m*, 1H, $\text{C}_2\text{-H}_b$), 1.42 (*d*, $J=6.25$ Hz, 3H, $\text{C}_7\text{-H}$), 1.33 (*m*, 6H, $\text{C}_3\text{-H}/\text{C}_4\text{-H}/\text{C}_5\text{-H}$), 0.89 (*t*, $J=6.52$ Hz, 3H, $\text{C}_6\text{-H}$)



$^{13}\text{C-RMN } \delta$ (100 MHz, CDCl_3): 163.57 (C_7), 147.43 (C_2), 146.24 (C_3), 144.46 (C_6), 143.96 (C_5), 73.67 (C_1), 35.83 (C_2), 31.57 (C_3), 25.16 (C_4), 22.51 (C_5), 19.99 (C_7), 13.98 (C_6')

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1719.10 cm^{-1} (f, $\text{C}=\text{O}$)

6.3.11. Pirazinoato de *R*-(-)-1-metil-hexilo (**5d**)

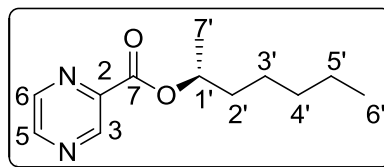
Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 7.68 mmoles (0.96 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 10 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 7.68 mmoles (1 g) de *R*-(-)-2-octanol com 11.52 mmoles (0.046 g, 1.5 eq.) de NaH, em banho de gelo, usando como solvente THF seco. Adicionou-se esta mistura reaccional ao cloreto do POA, ainda em banho de gelo e com agitação. Colocou-se posteriormente a mistura reaccional ao refluxo, em banho de parafina líquida, durante 27 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Procedeu-se posteriormente ao tratamento da mistura reaccional. Efectuou-se uma filtração, sendo, de seguida, evaporado o solvente (THF). Dissolveu-se o resíduo em diclorometano tendo sido lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se, por duas vezes, o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração vermelha.

Após espectroscopia $^1\text{H-RMN}$ verificou-se que o composto isolado estava misturado com um dos reagentes, *R*-(-)-2-octanol, tendo sido realizada outra purificação por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 5:1), tendo-se obtido um óleo sem coloração.

η = 33%

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.30 (*d*, *J*=1.20 Hz, 1H, C₃-H), 8.74 (*m*, 2H, C₅-H/C₆-H), 5.28 (*m*, 1H, C₁-H), 1.81 (*m*, 1H, C₂-H_a), 1.66 (*m*, 1H, C₂-H_b), 1.40 (*d*, *J*=6.28 Hz, 3H, C₇-H), 1.31 (*m*, 6H, C₃'-H/C₄'-H/C₅'-H), 0.86 (*t*, *J*= 6.81 Hz, 3H, C₆'-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 163.34 (C₇), 147.19 (C₂), 146.00 (C₃), 144.26 (C₆), 143.73 (C₅), 73.48 (C₁'), 35.66 (C₇'), 31.49 (C₂'), 28.87 (C₄'), 25.25 (C₃'), 22.36 (C₅'), 19.80 (C₇'), 13.85 (C₆')

I.V. (filme) ν_{máx}: 1721.43 cm⁻¹ (f, C=O)

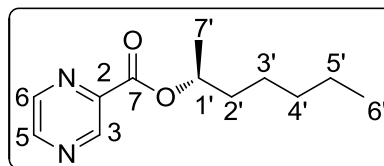
6.3.12. Pirazinoato de S-(+)-1-metil-hexilo (5e)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 7.68 mmoles (0.96 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 10 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 7.68 mmoles (1.22 mL) de *R*-(-)-2-octanol com 11.52 mmoles (0.046 g, 1.5 eq.) de NaH, em banho de gelo, usando como solvente THF seco. Adicionou-se esta mistura reaccional ao cloreto do POA, ainda em banho de gelo e com agitação. Colocou-se posteriormente a mistura reaccional ao refluxo, em banho de parafina líquida, durante 27 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Procedeu-se posteriormente ao tratamento da mistura reaccional. Efectuou-se uma filtração, sendo, de seguida, evaporado o solvente (THF). Dissolveu-se o resíduo em diclorometano tendo sido lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se, por duas vezes, o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração vermelha.

η = 66 %

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.31 (*d*, *J*=1.25 Hz, 1H, C₃-H), 8.76 (*m*, 2H, C₅-H/C₆-H), 5.29 (*m*, 1H, C₁-H), 1.82 (*m*, 1H, C₂-H_a), 1.67 (*m*, 1H, C₂-H_b), 1.41 (*d*, *J*=6.25 Hz, 3H, C₇-H), 1.29 (*m*, 6H, C₃'-H/C₄'-H/C₅'-H), 0.88 (*t*, *J*= 6.82 Hz, 3H, C₆'-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 163.57 (C₇), 147.44 (C₂), 146.25 (C₃), 144.47 (C₆), 143.95 (C₅), 73.68 (C₁'), 35.87 (C₇'), 31.69 (C₂'), 29.07 (C₄'), 25.45 (C₃'), 22.56 (C₅'), 20.00 (C₇'), 14.05 (C₆')

I.V. (filme) ν_{máx}: 1718.98 cm⁻¹ (f, C=O)

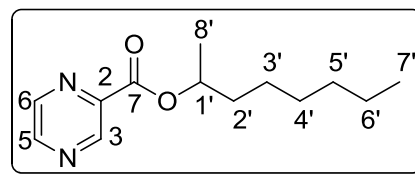
6.3.13. Pirazinoato de 1-metil-heptilo (5f)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (3.68 mL) de 2-octanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, com formação de um sólido branco. Adicionou-se 13 mL de diclorometano e de seguida o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação. De seguida colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 10 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Filtrou-se por vácuo, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração laranja.

$\eta = 59\%$

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.31 (*sl*, 1H, C₃-H), 8.76 (*d*, $J=2.72$ Hz, 2H, C₅-H / C₆-H), 5.29 (*m*, 1H, C₁'-H), 1.84 (*m*, 1H, C₂'-H_a), 1.67 (*m*, 1H, C₂'-H_b), 1.42 (*d*, $J=6.23$ Hz, 3H, C₈'-H), 1.29 (*m*, 8H, C₃'-H / C₄'-H / C₅'-H / C₆'-H), 0.88 (*t*, $J=6.50$ Hz, 3H, C₇'-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 163.57 (C₇), 147.43 (C₂), 146.24 (C₃), 144.46 (C₆), 143.96 (C₅), 73.68 (C₁'), 35.87 (C₂'), 31.69 (C₃'), 29.06 (C₄'), 25.45 (C₅'), 22.56 (C₆'), 20.00 (C₈'), 14.05 (C₇')

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1718.60 cm⁻¹ (f, C=O)

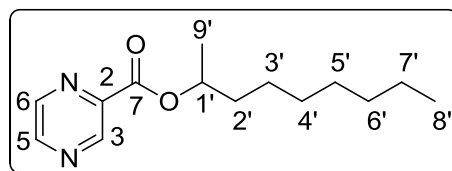
6.3.14. Pirazinoato de 1-metiloctilo (5g)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.31 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (3.92 mL) de 2-nonanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, com formação de um sólido branco. Adicionou-se 13 mL de diclorometano e de seguida o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação. De seguida colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 10 h. A A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Filtrou-se por vácuo, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 3:1), tendo-se obtido um óleo com coloração laranja.

$\eta = 58 \%$

$^1\text{H-RMN } \delta$ (400 MHz, CDCl_3): 9.32 (s, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 8.77 (m, 2H $\text{C}_5\text{-H} / \text{C}_6\text{-H}$), 5.30 (m, 1H, $\text{C}_1\text{-H}$), 1.42 (d, $J=6.25$ Hz, 3H, $\text{C}_9\text{-H}$), 1.83 (m, 1H, $\text{C}_2\text{-H}_a$), 1.65 (m, 1H, $\text{C}_2\text{-H}_b$), 1.31 (m, 10H, $\text{C}_3\text{-H} / \text{C}_4\text{-H} / \text{C}_5\text{-H} / \text{C}_6\text{-H} / \text{C}_7\text{-H}$), 0.88 (t, $J=6.62$ Hz, 3H, $\text{C}_8\text{-H}$)



$^{13}\text{C-RMN } \delta$ (100 MHz, CDCl_3): 163.58 (C_7), 147.44 (C_2), 146.26 (C_3), 144.47 (C_6), 143.96 (C_5), 73.69 (C_1), 35.87 (C_2), 31.76 (C_3), 29.36 (C_4), 29.17 (C_5), 25.50 (C_6), 22.63 (C_7), 20.01 (C_9), 14.08 (C_8)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1720.49 cm^{-1} (f, C=O)

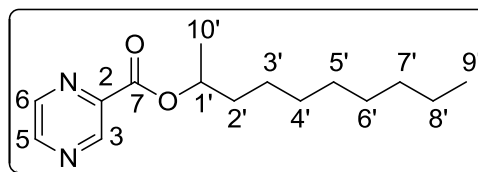
6.3.15. Pirazinoato de 1-metilnonilo (5h)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (4.41 mL) de 2-decanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, em THF seco em banho de gelo. De seguida juntou-se o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação, colocando-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 19 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Filtrou-se por vácuo, e evaporou-se o THF. De seguida, dissolveu-se o resíduo em diclorometano. Lavou-se a solução com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 5:3), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela clara.

$\eta = 64 \%$

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.32 (*sl*, 1H, C₃-H), 8.77 (*m*, 2H, C₅-H/C₆-H), 5.30 (*m*, 1H, C_{1'}-H), 1.82 (*m*, 1H, C₂-H_a), 1.69, (*m*, 1H, C₂-H_b), 1.42 (*d*, J= 6.27Hz, 3H, C_{10'}-H), 1.31 (*m*, 12H, C₃-H/C₄-H/C₅-H /C₆-H/C₇-H/ C₈-H), 0.88 (*t*, J=6.60 Hz, 3H, C₉-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 163.58 (C₇), 147.44 (C₂), 146.26 (C₃), 144.47 (C₆), 143.96 (C₅), 73.69 (C_{1'}), 35.87 (C₂), 31.83 (C₃), 29.46 (C₄), 29.40 (C₅), 29.22 (C₆), 25.50 (C₇), 22.65 (C₈), 20.01 (C_{10'}), 14.10 (C₉)

I.V. (filme) ν_{máx}: 1719.61 cm⁻¹ (f, C=O)

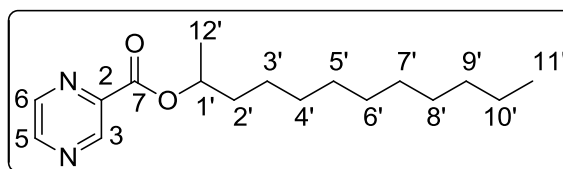
6.3.16. Pirazinoato de 1-metilundecilo (5i)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (5.10 mL) de 2-undecanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, com formação de um sólido branco. Adicionou-se 13 mL de diclorometano e de seguida o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação. De seguida colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 8 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Filtrou-se por vácuo, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

η = 76 %

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.32 (*sl*, 1H, C₃-H), 8.77 (*m*, 2H, C₅-H/C₆-H), 5.32 (*m*, 1H, C_{1'}-H), 1.83 (*m*, 1H, C₂-H_a), 1.66, (*m*, 1H, C₂-H_b), 1.42 (*d*, J= 6.26Hz, 3H, C_{12'}-H), 1.27 (*m*, 16H, C₃-H/C₄-H/C₅-H/C₆-H/C₇-H/ C₈-H/C₉-H/C₁₀-H), 0.88 (*t*, J=6.60 Hz, 3H, C_{11'}-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 163.58 (C₇), 147.44 (C₂), 146.27 (C₃), 144.47 (C₆), 143.96 (C₅), 73.69 (C_{1'}), 35.88 (C₂), 31.90 (C₃), 29.58 (C₄), 29.51 (C₅), 29.41 (C₆), 29.32 (C₇), 25.51 (C₈), 25.19 (C₉), 22.68 (C₁₀), 20.01 (C₁₂), 14.13 (C₁₁)

I.V. (filme) ν_{máx}: 1720.57cm⁻¹ (f, C=O)

6.3.17. Pirazinoato de *tert*-butilo (**6a**)

6.3.17.1. Síntese de pirazinoato de *tert*-butilo via método B

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (2.16 mL) de *tert*-butanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, com formação de um sólido branco. Adicionou-se 13 mL de diclorometano e de seguida o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação. De seguida colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 30h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

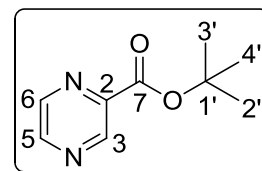
Filtrou-se por vácuo, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

$\eta = 21\%$

$^1\text{H-RMN } \delta$ (400 MHz, CDCl_3): 9.26 (*d*, $J=1.01$ Hz, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 8.73 (*m*, 2H, $\text{C}_5\text{-H}/\text{C}_6\text{-H}$), 1.68 (*s*, 9H, $\text{C}_2\text{-H}/\text{C}_3\text{-H}/\text{C}_4\text{-H}$)

$^{13}\text{C-RMN } \delta$ (100 MHz, CDCl_3): 162.9 (C_7), 147.12 (C_2), 146.09 (C_3), 144.81 (C_6), 144.37 (C_5), 83.37 (C_1'), 28.10 ($\text{C}_2', \text{C}_3', \text{C}_4'$)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1715.10 cm^{-1} (f, C=O)



6.3.17.2. Tentativa de síntese de pirazinoato de *tert*-butilo via tricloroacetimidato

Ao POA (0.100 g, 1 eq.) dissolvido em diclorometano, adicionou-se uma quantidade catalítica de trifluoroeterato de boro ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) (14 μL , 0.14 eq.). Juntou-se o *tert*-butil-2,2,2-tricloroacetimidato (288 μL , 2 eq.) e deixou-se a mistura reaccional com agitação à temperatura ambiente. Seguiu A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's. Devido à formação de um precipitado correspondente à formação da tricloroacetamida a mistura reaccional foi filtrada e o precipitado foi lavado com diclorometano. De seguida, efectuou-se uma lavagem com solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Secou-se com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e colocou-se a secar em bomba de vácuo. Dissolveu-se em hexano, filtrando-se novamente. Evaporou-se e secou-se o solvente (74). Purificou-se por cromatografia em coluna usando (hexano:acetato de etilo 1:1) como eluente, tendo-se obtido um sólido com coloração amarela escura.

6.3.18. Pirazinoato de 1,1-dimetilpropilo (**6b**)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (2.48 mL) de 2-metil-2-butanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, com formação de um sólido branco. Adicionou-se 13 mL de diclorometano e de seguida o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação. De seguida colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 12 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

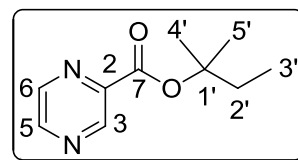
Filtrou-se por vácuo, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

$\eta = 28 \%$

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.24 (*sl*, 1H, C₃-H), 8.73 (*sl*, 2H, C₅-H/C₆-H), 1.99 (*q*, *J*=7.46 Hz, 2H, C₂-H), 1.63 (*s*, 6H, C₄-H/C₅-H), 1.00 (*t*, *J*=7.46 Hz, 3H, C₃-H)

¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 162.74 (C₇), 147.09 (C₂), 146.00 (C₃), 144.82 (C₆), 144.45 (C₅), 85.91 (C₁'), 33.47 (C₂'), 25.54 (C₄/C₅'), 8.36 (C₃')

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1715.72 cm⁻¹ (f, C=O)



6.3.19. Pirazinoato de 1,1-dimetilbutilo (**6c**)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (2.84 mL) de 2-metil-2-pentanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, com formação de um sólido branco. Adicionou-se 13 mL de diclorometano e de seguida o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação. De seguida colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 8 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Filtrou-se por vácuo, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por

cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração laranja.

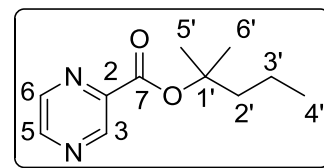
$\eta = 24 \%$

$^1\text{H-RMN } \delta$ (400 MHz, CDCl_3): 9.23 (*sl*, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 8.73 (*sl*, 2H, $\text{C}_5\text{-H}/\text{C}_6\text{-H}$), 1.93 (*m*, 2H, $\text{C}_2\text{-H}$), 1.64 (*s*, 6H, $\text{C}_5\text{-H}/\text{C}_6\text{-H}$), 1.45 (*m*, 2H, $\text{C}_3\text{-H}$) 0.97 (*t*, $J=7.28$ Hz, 3H, $\text{C}_4\text{-H}$)

$^{13}\text{C-RMN } \delta$ (100 MHz, CDCl_3): 162.74 (C_7), 147.08 (C_2), 146.01

(C_3), 144.83 (C_6), 144.44 (C_5), 85.70 (C_1), 43.00 (C_2), 26.05 (C_5/C_6), 17.31 (C_3), 14.39 (C_4)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1715.56 cm^{-1} (f, $\text{C}=\text{O}$)



6.3.20. Pirazinoato de 1,1-dimetilpentilo (**6d**)

6.3.20.1. Síntese de pirazinoato de 1,1-dimetilpentilo via método A

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (3.31 mL, 1 eq.) de 2-metil-2-hexanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 88h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela escura.

$\eta = 2 \%$

6.3.20.2. Síntese de pirazinoato de 1,1-dimetilpentilo via método B

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (3.31 mL, 1 eq.) de 2-metil-2-hexanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, com formação de um sólido branco. Adicionou-se 13 mL de diclorometano e de seguida o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação. De seguida colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 18h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

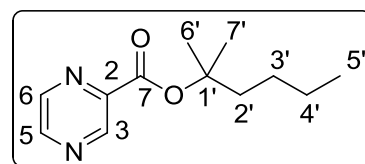
Filtrou-se por vácuo, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela escura.

$\eta = 22 \%$

$^1\text{H-RMN } \delta$ (400 MHz, CDCl_3): 9.22 (sl, 1H, $\text{C}_3\text{-H}$), 8.72 (sl, 1H, $\text{C}_5\text{-H}/\text{C}_6\text{-H}$), 1.94 (m, 2H, $\text{C}_2\text{-H}$), 1.62 (s, 6H, $\text{C}_6\text{-H}/\text{C}_7\text{-H}$), 1.37 (m, 4H, $\text{C}_3\text{-H}/\text{C}_4\text{-H}$), 0.91 (t, $J=6.93$ Hz, 3H, $\text{C}_5\text{-H}$)

$^{13}\text{C-RMN } \delta$ (100 MHz, CDCl_3): 162.73 (C_7), 147.06 (C_2),

146.00 (C_3), 144.85 (C_6), 144.45 (C_5), 85.75 (C_1), 40.48 (C_2), 26.06 (C_3), 22.97 (C_4), 14.05 (C_5)



I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1715.10 cm^{-1} (f, C=O)

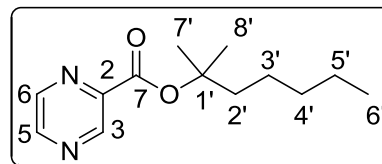
6.3.21. Pirazinoato de 1,1-dimetil-hexilo (**6e**)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 7.68 mmoles (0.96 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 10 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 7.68 mmoles (1.22 mL) de 2-metil-2-heptanol com 11.52 mmoles (0.046 g, 1.5 eq.) de NaH, em banho de gelo, usando como solvente THF seco. Adicionou-se esta mistura reaccional ao cloreto do POA, ainda em banho de gelo e com agitação. Colocou-se posteriormente a mistura reaccional ao refluxo, em banho de parafina líquida, durante 27 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Procedeu-se posteriormente ao tratamento da mistura reaccional. Efectuou-se uma filtração e procedeu-se a uma lavagem com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se, por duas vezes, o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

$\eta = 11 \%$

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.23 (*sl*, 1H, C₃-H), 8.73 (*sl*, 2H, C₅-H/C₆-H), 1.94 (*m*, 2H, C₂-H), 1.63 (*s*, 6H, C₇-H/C₈-H), 1.42 (*m*, 2H, C₃-H), 1.33 (*m*, 4H, C₄-H/C₅-H), 0.89 (*t*, *J*=6.57 Hz, 3H, C₆-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 162.73 (C₇), 147.07 (C₂), 146.00 (C₃), 144.84 (C₆), 144.45 (C₅), 85.76 (C₁'), 40.68 (C₂'), 32.04 (C₃'), 26.05 (C₇/C₈'), 23.66 (C₄'), 22.57 (C₅'), 14.03 (C₆').

I.V. (filme) ν_{máx}: 1716.53 cm⁻¹ (f, C=O)

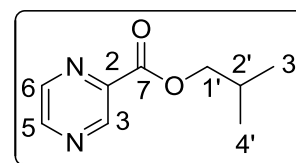
6.3.22. Pirazinoato de isobutilo (7a)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (2.08 mL, 1 eq.) de iso-butanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 12h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:5), tendo-se obtido um óleo com coloração castanha.

η = 63 %

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.25 (*d*, *J*=1.18 Hz, 1H, C₃-H), 8.76 (*d*, *J*= 2.36 Hz, 2H, C₆-H), 8.74 (*m*, 1H, C₅-H), 4.23 (*d*, *J*=6.88 Hz, 2H, C₁-H), 2.16 (*m*, 1H, C₂-H), 1.03 (*d*, *J*= 6.72, 6H, C₃-H / C₄-H)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 163.91 (C₇), 147.55 (C₂), 146.21 (C₃), 144.54 (C₆), 143.65 (C₅), 72.23 (C₁'), 27.79 (C₂'), 19.10 (C₃/C₄)

I.V. (filme) ν_{máx}: 1721.22 cm⁻¹ (f, C=O)

6.3.23. Pirazinoato de 2-metilbutilo (7b)

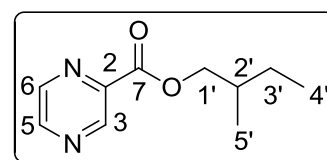
Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (2.45 mL) de 2-metil-1-butanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, com formação de um

sólido branco. Adicionou-se 13 mL de diclorometano e de seguida o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação. De seguida colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 12 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Filtrou-se por vácuo, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração laranja.

$\eta = 74\%$

$^1\text{H-RMN } \delta$ (400 MHz, CDCl_3): 9.31 (*sl*, 1 H, $\text{C}_3\text{-H}$), 8.77 (*sl*, 1H, $\text{C}_6\text{-H}$), 8.76 (*sl*, 1H, $\text{C}_5\text{-H}$), 4.35 (*m*, 1H, $\text{C}_1\text{-H}_a$), 4.26 (*m*, 1H, $\text{C}_1\text{-H}_b$), 1.95 (*m*, 1H, $\text{C}_2\text{-H}$), 1.54 (*m*, 1H, $\text{C}_3\text{-H}_a$), 1.29 (*m*, 1H, $\text{C}_3\text{-H}_b$), 1.03 (*d*, $J=6.77$ Hz, 3H, $\text{C}_5\text{-H}$), 0.97 (*t*, $J=7.48$ Hz, 3H, $\text{C}_4\text{-H}$)



$^{13}\text{C-RMN } \delta$ (100 MHz, CDCl_3): 163.97 (C_7), 147.54 (C_2), 146.21 (C_3), 144.56 (C_6), 143.68 (C_5), 70.89 (C_1), 34.17 (C_2), 26.04 (C_3), 16.39 (C_5), 11.22 (C_4)

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1722.40 cm^{-1} (f, C=O)

6.3.24. Pirazinoato de isopentilo (**8a**)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (2.44 mL, 1 eq.) de isopentanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 8 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:3), tendo-se obtido um óleo com coloração acastanhada.

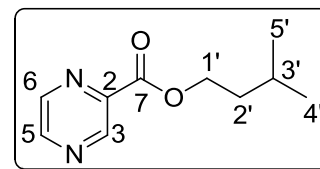
$\eta = 60\%$

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.32 (*sl*, 1H, C₃-H), 8.77 (*sl*, 1H, C₆-H), 8.75 (*sl*, 1H, C-H), 4.50 (*t*, J=6.77 Hz, 2H, C₁'-H), 1.74 (*m*, 2H, C₂'-H), 1.04 (*m*, 1H, C₃'-H) 0.98 (*m*, 6H, C₄'-H/C₅'-H)

¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 163.99 (C₇), 147.57 (C₂), 146.26

(C₃), 144.47 (C₆), 143.63 (C), 65.07 (C₁'), 37.23 (C₂'), 25.11 (C₃'), 22.47 (C₄'/C₅')

I.V. (filme) ν_{máx}: 1722.23 cm⁻¹ (f, C=O)



6.3.25. Pirazinoato de 4-clorobutilo (**9a**)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 7.68 mmoles (0.96 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 10 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 1.7 mmoles (250 mg, 0.22 eq.) de 2-metil-2-octanol com 11.52 mmoles (0.046 g, 1.5 eq.) de NaH, em banho de gelo, usando como solvente THF seco. Adicionou-se esta mistura reaccional ao cloreto do POA, ainda em banho de gelo e com agitação. Colocou-se posteriormente a mistura reaccional ao refluxo, em banho de parafina líquida, durante 19 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Procedeu-se posteriormente ao tratamento da mistura reaccional. Efectuou-se uma filtração e procedeu-se a uma lavagem com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se, por duas vezes, o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 5:3), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

η = 19 %

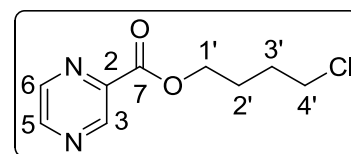
¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.30 (*sl*, 1H, C₃-H), 8.76 (*sl*, 1H, C₆-H), 8.73 (*sl*, 1H, C-H), 4.48 (*t*, J=6.01 Hz, 2H, C₁'-H), 3.60 (*t*, J=5.93 Hz, 2H, C₄'-H) 1.97 (*m*, 4H, C₂'-H/C₃'-H)

¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 164.01 (C₇), 147.83 (C₂),

146.37 (C₃), 144.59 (C₆), 143.47 (C₅), 66.57 (C₁'), 44.95 (C₄') 29.13 (C₃'), 26.15 (C₂')

I.V. (filme) ν_{máx}: 1724.75 cm⁻¹ (f, C=O)

EM-ESI m/z (int. rel., %): 237.06 [M + Na]⁺ (100)



6.3.26. Pirazinoato de fenilo (**10a**)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e

22.46 mmoles (2.11 g, 1 eq.) de fenol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 17h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:3), obtendo-se cristais brancos.

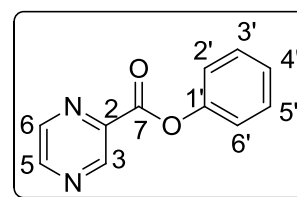
η = 50 %

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.49 (*sl*, 1H, C₃-H), 8.86 (*d*, *J*=2.26 Hz, 1H, C₆-H), 8.83 (*sl*, 1H, C₅-H), 7.31 (*m*, 3H, C₁-H/C₆-H/C₄-H), 7.47 (*m*, 2H, C₃-H/C₅-H)

¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 162.56 (C₇), 150.46 (C₂), 148.16

(C₃), 146.81 (C₆), 144.67 (C₅), 143.02 (C₁'), 129.68 (C₂/C₆'), 126.51 (C₃/C₅'), 121.46 (C₄')

I.V. (filme) $\nu_{\text{máx}}$: 1727.66 cm⁻¹ (f, C=O)



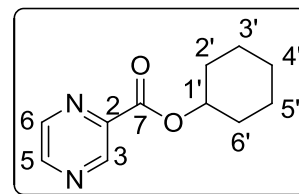
6.3.27. Pirazinoato de ciclo-hexilo (10b)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo e adicionaram-se 13 mL de diclorometano e 22.46 mmoles (2.41 mL, 1 eq.) de ciclo-hexanol. De seguida adicionaram-se 7 mL de diclorometano e 26.61 mmoles (3.70 mL, 1.2 eq.) de trietilamina destilada, de uma forma lenta e com agitação, a 0°C. Colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo por cerca de 13h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Retirou-se o sal da trietilamina por filtração, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:3), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela.

η = 54 %

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.31 (*sl*, 1H, C₃-H), 8.76 (*sl*, 2H, C₅-H / C₆-H), 5.14 (*m*, 1H, C₁-H), 2.04 (*m*, 2H, C₂-H_{eq} / C₆'-H_{eq}), 1.82 (*m*, 2H, C₃'-H_{eq} / C₅'-H_{eq}), 1.65 (*m*, 3H, C₂'-H_{ax} / C₄'-H_{ax} / C₆'-H_{ax}), 1.46 (*m*, 2H, C₃'-H_{ax} / C₅'-H_{ax}), 1.30 (*m*, 1H, C₄'-H_{eq})



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 163.32 (C₇), 147.40 (C₂), 146.25 (C₃), 144.47 (C₆), 144.03 (C₅), 75.11 (C₁'), 31.58 (C₂'/C₆'), 25.27 (C₃'/C₅'), 23.89 (C₄')

I.V. (filme) ν_{máx}: 1716.76 cm⁻¹ (f, C=O)

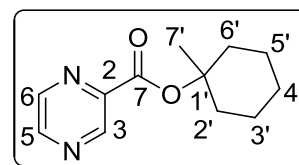
6.3.28. Pirazinoato de 1-metilciclo-hexilo (**10c**)

Para a síntese deste derivado do POA partiu-se inicialmente de 26.60 mmoles (3.30 g, 1.2 eq.) do ácido, aos quais se adicionou 25 mL de cloreto de tionilo. Após refluxo de 2h, evaporou-se o excesso de cloreto de tionilo. De seguida fez-se reagir 22.46 mmoles (2.91 mL) de metilciclohexanol com 33.69 mmoles (1.35 g, 1.5 eq.) de NaH, com formação de um sólido branco. Adicionou-se 13 mL de diclorometano e de seguida o cloreto de ácido, a esta mistura reaccional, com agitação. De seguida colocou-se no banho de parafina líquida em refluxo, durante 28 h. A evolução da reacção foi acompanhada por CCF's.

Filtrou-se por vácuo, sendo o filtrado posteriormente lavado com 20 mL de água desionizada. Após recolher a fase orgânica repetiu-se o procedimento anterior utilizando solução saturada de hidrogenocarbonato de sódio. Após secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, evaporou-se o solvente e purificou-se o resíduo obtido por cromatografia em coluna (hexano:acetato de etilo 1:1), tendo-se obtido um óleo com coloração amarela escura.

η = 28 %

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): 9.26 (*sl*, 1H, C₃-H), 8.73 (*sl*, 2H, C₅-H / C₆-H), 2.35 (*m*, 2H, C₂'-H_a / C₆'-H_a), 1.66 (*s*, 3H, C₇'-H), 1.58 (*m*, 5H, C₃'-H / C₄'-H_a / C₅'-H), 1.34 (*m*, 2H, C₂'-H_b / C₆'-H_b), 0.87 (*m*, 1H, C₄'-H_b)



¹³C-RMN δ (100 MHz, CDCl₃): 162.65 (C₇), 147.18 (C₂), 146.04 (C₃), 144.94 (C₆), 144.61 (C₅), 85.06 (C₁'), 36.66 (C₂'/C₆'), 31.03 (C₄'), 25.35 (C₇'), 22.27 (C₅'/C₃')

I.V. (filme) ν_{máx}: 1714.33 cm⁻¹ (f, C=O)

6.4. Estudos de estabilidade dos ésteres do ácido pirazinóico

Os estudos cinéticos foram realizados observando a diminuição da concentração do éster e o aumento da concentração do POA, ao longo do tempo. Para isso, as amostras foram analisadas por HPLC.

Antes de iniciar os estudos cinéticos escolheram-se os eluentes adequados para cada derivado, de modo a os tempos de retenção do ácido e do éster não serem demasiado próximos, observando-se uma boa separação e definição dos sinais no cromatograma. Ao todo, utilizaram-se dois eluentes de diferentes composições quantitativas. Para os derivados com cadeias laterais até 7 carbonos utilizou-se uma fase móvel composta por 60 % de acetonitrilo e 40 % de fase aquosa. Para os restantes derivados, com mais de 7 carbonos no grupo lateral, a fase móvel tinha a mesma composição mas nas proporções 85:15 – **Apêndice I**. A fase aquosa era constituída por uma solução de di-hidrogeno fosfato de potássio (0.05 moles/dm³) e 0.05% (v/v) de ácido orto-fosfórico (85%) em água desionizada. As análises foram realizadas com o fluxo de 1mL/min, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 264 nm.

Os valores de k_{obs} foram determinados através de um processo de regressão linear:

$$-k_{obs} = \frac{\ln(\text{conc.})_t}{\ln(\text{conc.})_0}$$

ou seja

$$\ln(\text{conc.})_t = -k_{obs} t + \ln(\text{conc.})_0$$

Sendo $(\text{conc.})_t$ as concentrações determinadas ao longo do tempo e $(\text{conc.})_0$ a concentração no tempo inicial ($t=0$). As reacções de hidrólise foram seguidas até serem observados três tempos de semi-vida.

6.4.1. Estudos de estabilidade em tampão fosfato

Preparou-se uma solução tampão com concentração de 0.05 M e força iónica 0.15M, como descrito no **Apêndice II**. As reacções processaram-se sempre com uma concentração inicial de substrato igual a 5×10^{-4} M com 2% de acetonitrilo, para facilitar a dissolução do substrato. Colocaram-se as soluções à temperatura de 37°C, retirando alíquotas de 50 µL que se colocavam em 450 µL de solução aquosa de sulfato de zinco a 1 % diluída em acetonitrilo, na proporção de 1:1 sendo analisadas de seguida, por injeção num aparelho de HPLC.

6.4.2. Estudos de estabilidade em plasma humano

O sangue foi recolhido em heparinato de sódio, tendo sido centrifugado e recolhido o sobrenadante. Foi armazenado em volumes de aproximadamente 1 mL em *ependorfs* individuais e congelados a -20°C .

Os estudos de estabilidade foram efectuados em soluções de plasma humano diluído a 80% com tampão fosfato $\text{pH}=7.4$ de concentração total igual a 0.05M e força iónica igual a 0.15M à temperatura de 37°C . O meio das incubações continha sempre acetonitrilo numa percentagem de final de 2% sendo os substratos adicionados a partir de soluções - mãe de concentração igual a 10^{-1} M em acetonitrilo. As reacções de hidrólise processaram-se sempre com a concentração inicial de substrato igual a $5 \times 10^{-4}\text{ M}$.

O procedimento de amostragem foi semelhante ao usado para os estudos de estabilidade em tampão fosfato. Retiravam-se alíquotas de $50\ \mu\text{L}$, diluindo-se em $450\ \mu\text{L}$ de solução aquosa de sulfato de zinco a 1 % diluída em acetonitrilo, na proporção de 1:1. Em contacto com esta solução as enzimas plasmáticas precipitam e a reacção de hidrólise pára. As amostras são centrifugadas a 15000 rotações por minuto durante 10 minutos, recolhendo-se o sobrenadante para análise por HPLC.

VII – Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

1. Ma Z, Ginsberg AM, Spigelman M. Comprehensive Medicinal Chemistry II. Triggle D, Taylor, J.B. , editor: Elsevier; 2006.
2. WHO. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Report W, editor. Geneva, Switzerland 2010.
3. Ahmad S. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Respir Res.* 2010;11(1):169.
4. Ryan KJ, Ray CG, Sherris JC. Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases. 4 ed. Ryan KJ, Ray CG, editors: McGraw-Hill; 2004.
5. Plattner J, Desai MC. Comprehensive Medicinal Chemistry II: Volume 7: THERAPEUTIC AREAS II: Cancer, Infectious Diseases, Inflammation & Immunology and Dermatology: Elsevier; 2006.
6. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, López-Llano J, Fuentes P, Valencia E, et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2009;89(2):109-13.
7. Loddenkemper R, Hauer B. Drug Resistant Tuberculosis: A Worldwide Epidemic Poses a New Challenge. *Dtsch Arztebl International*. 2010 January 7, 2010;107(1-2):10-9.
8. Burman WJ. Rip Van Winkle Wakes Up: Development of Tuberculosis Treatment in the 21st Century. *Clin Infect Dis.* 2010 May 15, 2010;50(Supplement 3):S165-S72.
9. Ahmad S, Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Respir Med.* 2009;103(12):1777-90.
10. Cotes K, N'goma JB, Dhoub R, Douchet I, Maurin D, Carriere F, et al. Lipolytic enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008 Apr;78(5):741-9.
11. Snyder E, Kampanya N, Lu J, Nordberg E, Karur H, Shukla M, et al. PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:401-6.
12. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. [10.1038/31159]. 1998;393(6685):537-44.
13. Cotes K, Dhoub R, Douchet I, Chahinian H, de Caro A, Carriere F, et al. Characterization of an exported monoglyceride lipase from *Mycobacterium tuberculosis* possibly involved in the metabolism of host cell membrane lipids. *Biochem J.* 2007 Dec 15;408(3):417-27.
14. Russel DG, Purdy GE, Owens RM, Rohde KH, Yates RM. *Mycobacterium tuberculosis* and the four-minute phagosome. *ASM.* 2005;71(10):459-63.
15. Pandit P, Tiwari S. Recent advances in the chemotherapy of tuberculosis. 2011;6(1):95-8.

16. Jonmalung J, Prammananan T, Leechawengwongs M, Chairasert A. Surveillance of pyrazinamide susceptibility among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Siriraj Hospital, Thailand. *BMC Microbiol.* 2010;10(1):1-2.
17. Lee ASG, Tang LLH, Lim IHK, Yew Wong S. Characterization of pyrazinamide and ofloxacin resistance among drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Singapore. *Int J Infect Dis.* 2002;6(1):48-51.
18. Cynamon MH, Klemens SP, Chou TS, Gimi RH, Welch JT. Antimycobacterial activity of a series of pyrazinoic acid esters. *J Med Chem.* 1992;35(7):1212-5.
19. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* 2003;7(1):6-21.
20. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother.* 2003 November 1, 2003;52(5):790-5.
21. Pyrazinamide. *Tuberculosis.* 2008;88(2):141-4.
22. Mitchison DA, Fourie PB. The near future: Improving the activity of rifamycins and pyrazinamide. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland).* 2010;90(3):177-81.
23. Gu P, Constantino L, Zhang Y. Enhancement of the antituberculosis activity of weak acids by inhibitors of energy metabolism but not by anaerobiosis suggests that weak acids act differently from the front-line tuberculosis drug pyrazinamide. *J Med Microbiol.* 2008 Sep;57(Pt 9):1129-34.
24. Sayahi H, Zimhony O, Jacobs Jr WR, Shekhtman A, Welch JT. Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011;21(16):4804-7.
25. Zimhony O, Vilcheze C, Arai M, Welch JT, Jacobs WR, Jr. Pyrazinoic acid and its n-propyl ester inhibit fatty acid synthase type I in replicating tubercle bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Feb;51(2):752-4.
26. Portugal I, Barreiro L, Moniz-Pereira J, Brum L. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jul;48(7):2736-8.
27. Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Adv Drug Delivery Rev.* 2005;57(10):1471-85.
28. Testa B, Mayer JM. Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: chemistry, biochemistry, and enzymology. Zurich: VHCA-WILEY; 2003.
29. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE, et al. Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 2011 September 16, 2011;333(6049):1630-2.

30. Liederer BM, Borchardt RT. Enzymes involved in the bioconversion of ester-based prodrugs. *J Pharm Sci.* 2006;95(6):1177-95.
31. Silva AT, Chung MC, Castro LF, Guido RV, Ferreira EI. Advances in Prodrug Design. *Mini Rev Med Chem.* 2005;5:893-914.
32. Patrick GL. *An Introduction to Medicinal Chemistry.* Fourth ed: Oxford University Press; 2004.
33. Zhang D, Zhu M, Humphreys WG. *Drug Metabolism in Drug Design and Development:* Wiley-Interscience; 2007.
34. Vistoli G, Pedretti A, Mazzolari A, Testa B. In silico prediction of human carboxylesterase-1 (hCES1) metabolism combining docking analyses and MD simulations. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(1):320-9.
35. Fojan P, Jonson PH, Petersen MTN, Petersen SB. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie.* 2000;82(11):1033-41.
36. Wheelock CE, Nakagawa Y. Carboxylesterases – from function to the field - an overview of carboxylesterase biochemistry, structure-activity relationship, and use in environmental field monitoring. *J Pestic Sci.* 2010;35(3):215-7.
37. Heikinheimo P, Goldman A, Jeffries C, Ollis DL. Of barn owls and bankers: a lush variety of [alpha]/[beta] hydrolases. *Structure.* 1999;7(6):R141-R6.
38. Satoh T, Hosokawa M. The Mammalian Carboxylesterases: From Molecules to Functions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38(1):257-88.
39. Li B, Sedlacek M, Manoharan I, Boopathy R, Duysen EG, Masson P, et al. Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(11):1673-84.
40. Bozyczko-Coyne D, Williams M. *Comprehensive Medicinal Chemistry II.* Triggler D, Taylor, J.B. , editor: Elsevier; 2006.
41. Masson P, Lockridge O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch Biochem Biophys.* 2010;494(2):107-20.
42. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(2):83-106.
43. Yang F, Bian C, Zhu L, Zhao G, Huang Z, Huang M. Effect of human serum albumin on drug metabolism: Structural evidence of esterase activity of human serum albumin. *J Struct Biol.* 2007;157(2):348-55.
44. Salvi A, Carrupt P-A, Mayer JM, Testa B. Esterase-like Activity of Human Serum Albumin Toward Prodrug Esters of Nicotinic Acid. *Drug Metab Dispos.* 1997 April 1, 1997;25(4):395-8.

45. Zhang M, Wang J-d, Li Z-f, Xie J, Yang Y-p, Zhong Y, et al. Expression and characterization of the carboxyl esterase Rv3487c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif.* 2005;42(1):59-66.
46. Cynamon MH, Speirs RJ, Welch JT. In Vitro Antimycobacterial Activity of 5-Chloropyrazinamide. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 February 1, 1998;42(2):462-3.
47. Speirs RJ, Welch JT, Cynamon MH. Activity of n-propyl pyrazinoate against pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: investigations into mechanism of action of and mechanism of resistance to pyrazinamide. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Jun;39(6):1269-71.
48. Simões MF, Valente E, Gómez MJR, Anes E, Constantino L. Lipophilic pyrazinoic acid amide and ester prodrugs: Stability, activation and activity against *M. tuberculosis*. *Eur J Pharm Sci.* 2009;37(3-4):257-63.
49. Bergmann KE, Cynamon MH, Welch JT. Quantitative Structure-Activity Relationships for the in Vitro Antimycobacterial Activity of Pyrazinoic Acid Esters. *J Med Chem.* 1996;39(17):3394-400.
50. Fernandes JPS, Pasqualoto KFM, Felli VMA, Ferreira EI, Brandt CA. QSAR Modeling of a Set of Pyrazinoate Esters as Antituberculosis Prodrugs. *Arch Pharm (Weinheim).* 2010;343(2):91-7.
51. Clayden JP, Greeves N, Warren SG, Wothers PD. *Organic Chemistry: Oxford Univ. Press;* 2000.
52. Cynamon MH, Gimi R, Gyenes F, Sharpe CA, Bergmann KE, Han HJ, et al. Pyrazinoic Acid Esters with Broad Spectrum in Vitro Antimycobacterial Activity. *J Med Chem.* 1995;38(20):3902-7.
53. DeWit MA, Gillies ER. Design, synthesis, and cyclization of 4-aminobutyric acid derivatives: potential candidates as self-immolative spacers. *Org Biomol Chem.* 2010;9(6):1846-54.
54. Abdel-Rahman Adel AH, Winterfeld Gottfried A, Takhi M, Schmidt Richard R. Trichloroacetimidate as a Leaving Group in the Ferrier Rearrangement: Highly Stereoselective Synthesis of Pseudogalactal Glycosides. *Eur J Org Chem.* 2002;2002(4):713-7.
55. Wu HY, Ding JC, Wang S. Tetrahydrofuran Ring-opening with Acyloxyphosphonium Bromide Catalyzed by Zinc Bromide: An Effective Method for the Preparation of 4-Bromobutyl Esters. *Chin Chem Lett.* 2002;13(7):589-92.
56. Perrin DD, Dempsey B. *Buffers for pH and metal ion control: Chapman and Hall;* 1974.
57. Valente E. β -lactamas como inibidores de proteases de serina e ativação de pró-fármacos por esterases. Lisboa: Universidade de Lisboa; 2009.

58. Krogsgaard-Larsen P, Bundgaard H. A Textbook of drug design and development: Harwood Academic Publishers; 1991.
59. Viveiros M, Leandro C, Amaral L. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22(3):274-8.
60. Muth JED. Basic statistics and pharmaceutical statistical applications: Marcel Dekker; 1999.
61. Smith DA, Waterbeemd H, Walker DK. Pharmacokinetics and metabolism in drug design: Wiley-VCH; 2006.
62. Smith DA, van de Waterbeemd H, Walker DK. Physicochemistry: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006.
63. Tetko IV, Gasteiger J, Todeschini R, Mauri A, Livingstone D, Ertl P, et al. Virtual computational chemistry laboratory - design and description. *J Comput Aid Mol Des*. 2005;19:453-63.
64. VCCLAB. Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org>. 2005.
65. Thomas G. Medicinal chemistry: an introduction: John Wiley; 2007.
66. Taft RW. Polar and Steric Substituent Constants for Aliphatic and o-Benzoate Groups from Rates of Esterification and Hydrolysis of Esters. *J Am Chem Soc*. 1952;74(12):3120-8.
67. Hansch C, Leo A. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology: Wiley; 1979.
68. Perrin DD, Dempsey B, Serjeant EP. pKa prediction for organic acids and bases: Chapman and Hall; 1981.
69. Burger A, Abraham DJ. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery: Drug discovery. 6 ed: Wiley; 2003.
70. Selassie CD, Mekapati SB, Verma RP. QSAR: Then and Now. *ChemInform*. 2003;34(18):no-no.
71. Charton M. Topics in current chemistry - Steric Effects in Drug Design: Springer; 1983.
72. Zhang Y, Permar S, Sun ZH. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *J Med Microbiol*. 2002 Jan;51(1):42-9.
73. Armarego WLF, Chai CLL. Purification of Laboratory Chemicals. 6th ed: Oxford: Elsevier Inc.; 2009.
74. DeWit MA, Gillies ER. Design, synthesis, and cyclization of 4-aminobutyric acid derivatives: potential candidates as self-immolative spacers. *Org Biomol Chem*. 2011;9(6):1846-54.
75. Perrin DD, Dempsey B. Buffers for PH and Metal Ion Control: John Wiley & Sons, Incorporated; 1979.

VIII – Apêndices

APÊNDICE I – Eluentes usados para cada composto e respectivo tempo de retenção**Compostos e respectivos tempos de retenção para o eluente 60:40 (ACN:Fase aquosa)**

Nº de carbonos (cadeia lateral)		Composto	Tempo de retenção (min)
3	5a	Pirazinoato de isopropilo	3.6
	5b	Pirazinoato de <i>sec</i> -butilo	4.3
4	6a	Pirazinoato de <i>terc</i> -butilo	4.3
	7a	Pirazinoato de isobutilo	4.6
5	4a	Pirazinoato de pentilo	6
	6b	Pirazinoato de 1,1-dimetilpropilo	5.2
	7b	Pirazinoato de 2-metilbutilo	5.6
	8a	Pirazinoato de isopentilo	5.7
6	4b	Pirazinoato de hexilo	7.9
	6c	Pirazinoato de 1,1-dimetilbutilo	6.7
	10a	Pirazinoato de fenilo	4.1
	10b	Pirazinoato de ciclo-hexilo	5.9
7	4c	Pirazinoato de heptilo	11
	5c	Pirazinoato de 1-metil-hexilo	9.6
	6d	Pirazinoato de 1,1-dimetilpentilo	8.8
	10c	Pirazinoato de 1-metilciclo-hexilo	7.2

Compostos e respectivos tempos de retenção para o eluente 85:15 (ACN:Fase aquosa)

Nº de carbonos (cadeia lateral)		Composto	Tempo de retenção
4	9a	Pirazinoato de 4-clorobutilo	9.35
	4d	Pirazinoato de octilo	5.8
8	5f	Pirazinoato de 1-metil-heptilo	5.2
	6e	Pirazinoato de 1,1-dimetilhexilo	5.1
9	4e	Pirazinoato de nonilo	7.5
	5g	Pirazinoato de 1-metiloctilo	6.6
10	4f	Pirazinoato de decilo	9.5
	5h	Pirazinoato de 1-metilnonilo	8.1
11	4g	Pirazinoato de undecilo	12.4
12	5i	Pirazinoato de 1-metilundecilo	14

APÊNDICE II – Cálculos para fazer as soluções tampão com pH 7.4, concentração 0.05 M e força iônica 0.15 M

Para fazer as soluções tampão com pH 7.4, concentração 0.05 M e força iônica 0.15 M, fizeram-se cálculos baseados nas seguintes equações (75).

pH da solução:

$$pK_a' = pK_a - (2n-1) \times \text{corr.} \Leftrightarrow pK_a' = 7.2 - 3 \times 0.1235$$

$$n=2$$

$$pK_a' (\text{H}_2\text{PO}_4^- \leftrightarrow \text{HPO}_4^{2-}) = 7.2$$

Se $I = 0.15 \text{ M}$

$$I = 0.1 \rightarrow \text{corr}_1 = 0.111$$

$$I = 0.2 \rightarrow \text{corr}_2 = 0.136$$

$$I = 0.15 \rightarrow \text{corr} = \frac{\text{corr}_1 + \text{corr}_2}{2} = 0.1235$$

Concentração da solução:

$$\text{pH} = pK_a' + \log \frac{b}{a}$$

$$a+b = 0.05 \text{ M}$$

a = espécies ácidas

b = espécies básicas

Força iônica (I)

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i \times z_i^2$$

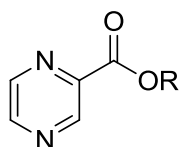
c – concentração das espécies iônicas em solução

z – carga das espécies iônicas em solução

Para preparar as soluções tampão fosfato com concentração 0.05 M e força iônica 0.15 M com a pH 7.4 pipetou-se para um balão volumétrico de 50 mL, 2.65 mL de solução (H_2PO_4^-) com molaridade 0.2 M, 9.85 mL de solução (HPO_4^{2-}) com molaridade 0.2 M e 1.06 mL de solução NaClO_4 com molaridade 1 M, obtendo um volume total de 13.56 mL e perfazendo-se posteriormente, o volume, com água desionizada.

IX – Anexos

ANEXO I – Resultados dos estudos de actividade *in vitro* dos derivados sintetizados em *M. smegmatis*, realizados pela Mestre Marta Costa (CPM-URIA).



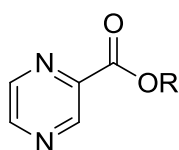
Concentração Mínima Inibitória
(CMI)

pH 5.9

pH 6.5

Composto	R	pH 5.9		pH 6.5	
		µg/mL	mM	µg/mL	mM
4a	C ₄ H ₉	—	—	—	—
4b	C ₅ H ₁₁	—	—	400	1.92
4c	C ₆ H ₁₃	200	0.900	400	1.80
4d	C ₇ H ₁₅	400	1.69	—	—
4e	C ₈ H ₁₇	100	0.400	200	0.799
4f	C ₉ H ₁₉	100	0.378	100	0.378
4g	C ₁₀ H ₂₁	25	0.090	100	0.359
5a	(CH ₃)CH ₃	—	—	200	1.20
5b	(CH ₃)C ₂ H ₅	—	—	200	1.11
5c	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	—	—	400	1.80
(R)-5d	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	—	—	—	—
(S)-5e	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	100	0.450	100	0.450
5f	(CH ₃)C ₆ H ₁₃	—	—	200	0.846
5g	(CH ₃)C ₇ H ₁₅	—	—	200	0.799
5h	(CH ₃)C ₈ H ₁₇	50	0.189	200	0.757
5i	(CH ₃)C ₁₀ H ₂₁	100	0.342	100	0.342
6a	(CH ₃) ₂ CH ₃	—	—	400	2.22
6b	(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅	>400	>2.06	400	2.06
6c	(CH ₃) ₂ C ₃ H ₇	>400	>1.92	400	1.92
6d	(CH ₃) ₂ C ₄ H ₉	—	—	200	0.900
6e	(CH ₃) ₂ C ₅ H ₁₁	200	0.846	200	0.846
7a	CH(CH ₃) ₂	100	0.555	400	2.22
7b	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	400	2.06	—	—
8a	C ₃ H ₆ CH(CH ₃) ₂	—	—	200	1.03
9a	C ₄ H ₈ Cl	400	1.86	200	0.932
10a	C ₆ H ₅	—	—	100	0.499
10b	C ₆ H ₁₀	—	—	200	0.970
10c	(CH ₃)C ₆ H ₁₀	200	0,908	200	0.908

ANEXO II - Resultados dos estudos de actividade *in vitro* dos derivados sintetizados em *M. bovis* BCG, realizados pela Mestre Marta Costa (CPM-URIA).



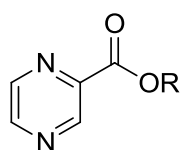
Concentração Mínima Inibitória
(CMI)

pH 5.9

pH 6.5

Composto	R	Concentração Mínima Inibitória (CMI)			
		pH 5.9		pH 6.5	
		µg/mL	mM	µg/mL	mM
4a	C ₄ H ₉	—	—	—	—
4b	C ₅ H ₁₁	400	1.92	400	1.92
4c	C ₆ H ₁₃	400	1.80	400	1.80
4d	C ₇ H ₁₅	<12.5	<0.053	200	0.846
4e	C ₈ H ₁₇	<12.5	<0.050	200	0.799
4f	C ₉ H ₁₉	>400	>0.153	400	1.513
4g	C ₁₀ H ₂₁	100	0.359	100	0.359
5a	(CH ₃)CH ₃	>400	>2.41	200	1.20
5b	(CH ₃)C ₂ H ₅	<12.5	<0.069	200	1.11
5c	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	100	0.450	400	1.80
(R)-5d	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	—	—	200	0.900
(S)-5e	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	<12.5	<0.056	100	0.450
5f	(CH ₃)C ₆ H ₁₃	100	0.423	200	0.846
5g	(CH ₃)C ₇ H ₁₅	200	0.799	200	0.799
5h	(CH ₃)C ₈ H ₁₇	50	0.189	200	0.757
5i	(CH ₃)C ₁₀ H ₂₁	400	1.37	100	0.342
6a	(CH ₃) ₂ CH ₃	400	2.22	400	2.22
6b	(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅	100	0.515	400	2.06
6c	(CH ₃) ₂ C ₃ H ₇	50	0.240	400	1.92
6d	(CH ₃) ₂ C ₄ H ₉	>400	>1.80	200	0.900
6e	(CH ₃) ₂ C ₅ H ₁₁	100	0.423	200	0.846
7a	CH(CH ₃) ₂	400	2.22	100	0.555
7b	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	200	1.03	200	1.03
8a	C ₃ H ₆ CH(CH ₃) ₂	400	2.06	200	1.03
9a	C ₄ H ₈ Cl	100	0.466	200	0.932
10a	C ₆ H ₅	50	0.249	100	0.500
10b	C ₆ H ₁₀	100	0.485	200	0.970
10c	(CH ₃)C ₆ H ₁₀	100	0.454	200	0.908

ANEXO III - Resultados dos estudos de actividade *in vitro* dos derivados sintetizados em *M. tuberculosis* H37Ra, realizados pelo Mestre Nuno Carmo (CPM-URIA).



Concentração Mínima Inibitória
(CMI)

Composto	R	$\mu\text{g/mL}$	mM
4a	C ₄ H ₉	100	0.515
4b	C ₅ H ₁₁	200	0.960
4c	C ₆ H ₁₃	50	0.225
4d	C ₇ H ₁₅	200	0.846
4e	C ₈ H ₁₇	50	0.200
4f	C ₉ H ₁₉	100	0.378
4g	C ₁₀ H ₂₁	25	0.090
5a	(CH ₃)CH ₃	200	1.20
5b	(CH ₃)C ₂ H ₅	100	0.555
5c	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	100	0.450
(R)-5d	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	200	0.900
(S)-5e	(CH ₃)C ₅ H ₁₁	100	0.450
5f	(CH ₃)C ₆ H ₁₃	100	0.423
5g	(CH ₃)C ₇ H ₁₅	50	0.200
5h	(CH ₃)C ₈ H ₁₇	<12.5	<0.047
5i	(CH ₃)C ₁₀ H ₂₁	<12.5	<0.043
6a	(CH ₃) ₂ CH ₃	200	1.11
6b	(CH ₃) ₂ C ₂ H ₅	200	1.03
6c	(CH ₃) ₂ C ₃ H ₇	400	1.92
6d	(CH ₃) ₂ C ₄ H ₉	200	0.900
6e	(CH ₃) ₂ C ₅ H ₁₁	200	0.846
7a	CH(CH ₃) ₂	100	0.555
7b	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	100	0.515
8a	C ₃ H ₆ CH(CH ₃) ₂	100	0.515
9a	C ₄ H ₈ Cl	100	0.466
10a	C ₆ H ₅	100	0.500
10b	C ₆ H ₁₀	100	0.485
10c	(CH ₃)C ₆ H ₁₀	200	0.908
PZA	NH ₂	200	1.62
POA	OH	400	3.22